

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 984 851**

(51) Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2016 E 22168161 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024 EP 4063397**

(54) Título: **Receptores de antígeno químéricos basados en anticuerpos de dominio único y métodos de uso de los mismos**

(30) Prioridad:

11.08.2015 CN 201510490002
02.11.2015 CN 201510733585

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2024

(73) Titular/es:

LEGEND BIOTECH IRELAND LIMITED (100.0%)
One Spencer Dock
North Wall Quay, Dublin 1, IE

(72) Inventor/es:

FAN, XIAOHU;
CHOU, CHUAN-CHU;
ZHUANG, QIUCHUAN;
WANG, PINGYAN;
WANG, LIN;
YANG, LEI y
HAO, JIAYING

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 984 851 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígeno químéricos basados en anticuerpos de dominio único y métodos de uso de los mismos

Campo de la presente invención

5 La presente invención se refiere a receptores de antígeno químéricos que comprenden anticuerpos de dominio único, células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética y usos de los mismos. La presente divulgación se refiere adicionalmente a la activación y expansión de células para usos terapéuticos, especialmente para inmunoterapia de células T basada en receptores de antígeno químéricos.

Antecedentes de la presente invención

10 Con el desarrollo de inmunoterapia tumoral y tecnología clínica, la inmunoterapia de células T de receptores de antígeno químéricos (CAR-T) es ahora uno de los enfoques de inmunoterapia tumoral más prometedores. Generalmente, un receptor de antígeno químérico (CAR) comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio de unión al antígeno extracelular puede comprender un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que se dirige a un antígeno tumoral identificado. Los CAR se pueden expresar sobre la superficie de las células T utilizando técnicas de transfección génica. Tras la unión 15 al antígeno tumoral diana, los CAR pueden activar las células T para iniciar una respuesta antitumoral específica de una manera dependiente del antígeno sin estar limitados por la disponibilidad de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) específico para el antígeno tumoral diana.

El documento WO 2013/123061 Se refiere a CAR biespecíficos basados en scFv.

20 Grada et al., Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2013, Vol. 2, e105 estudiaron un TanCAR que mediaba la activación biespecífica y el direccionamiento de células T.

Jamani et al., Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 2014, Vol. 1840, Núm. 1, páginas 378-386 informaron de CAR anti-HER2 oligoclonales que comprendían un único dominio V_{HH}.

25 Los anticuerpos de dominio único (sdAb) son diferentes de los anticuerpos de 4 cadenas convencionales por tener un dominio variable de anticuerpo monomérico único. Por ejemplo, los camélidos y tiburones producen anticuerpos de dominio único denominados anticuerpos solo de cadena pesada (HcAb), que carecen naturalmente de cadenas ligeras. El fragmento de unión a antígeno en cada brazo de los anticuerpos solo de cadena pesada de camélido tiene un único dominio variable de cadena pesada (V_{HH}), que puede tener alta afinidad por un antígeno sin la ayuda de una cadena ligera. El V_{HH} de camélido se conoce como el fragmento de unión a antígeno funcional más pequeño con un peso molecular de aproximadamente 15 kD.

30 Breve compendio de la presente invención

La presente invención proporciona receptores de antígeno químéricos (CAR) basados en anticuerpos de dominio único (V_{HH}), células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética, y usos de los mismos en inmunoterapia contra el cáncer como se define en las reivindicaciones.

35 La presente invención proporciona un receptor de antígeno químérico (CAR) que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer sdAb que se une específicamente a un primer antígeno y un segundo sdAb que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde cada uno del primer y segundo sdAb es un V_{HH}; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular; en donde el primer sdAb es un sdAb anti-BCMA que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una 40 CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y en donde el segundo sdAb es un sdAb anti-BCMA que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

45 En algunas realizaciones, el primer sdAb está localizado en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del segundo sdAb.

En algunas realizaciones, el primer sdAb y/o el segundo sdAb son de camélido, químéricos o humanizados.

En algunas realizaciones, el primer sdAb y el segundo sdAb se fusionan directamente entre sí a través de un enlace peptídico.

50 En algunas realizaciones, el primer sdAb y el segundo sdAb se fusionan entre sí a través de un conector peptídico. En una realización, el conector peptídico no tiene más de 50 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria. En una realización, el dominio de señalización intracelular primario es el dominio de señalización intracelular primario de CD3 ζ .

- 5 En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el dominio de señalización coestimulador de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y sus combinaciones, preferiblemente CD137.
- 10 La presente invención también proporciona el CAR de la invención que comprende adicionalmente un dominio bisagra localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión al antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. La presente invención también proporciona el CAR de la invención que comprende adicionalmente un péptido señal localizado en el extremo N-terminal del polipéptido.
- 15 La presente invención también proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR de la invención.
- 20 La presente invención también proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la invención. En una realización, el vector es un vector lentiviral. En una realización, el vector lentiviral es un vector lentiviral autoinactivante.
- 25 La presente invención también proporciona una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética que comprende el CAR de la invención, el ácido nucleico aislado de la invención o el vector de la invención. En una realización, la célula efectora inmunitaria es una célula T.
- 30 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un individuo. En una realización, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es autóloga.
- 40 En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica. En una realización, el cáncer es mieloma múltiple.
- 45 Se divulga como referencia un sdAb anti-BCMA que comprende las regiones CDR de uno cualquiera de SEQ ID NO: 78, 79, 81 a 86 y 88. Se divulga, pero no se reivindica, que el sdAb anti-BCMA comprende uno cualquiera de los siguientes:
- 50 (1) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29;
- (2) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;
- (4) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;
- (5) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;
- (6) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;
- (7) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;
- (8) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;
- (9) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

5 (11) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. Como referencia, se divulga un sdAb anti-BCMA comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78, 79, 81 a 86 y 88. Un primer sdAb anti-BCMA comprendido en el CAR de la invención comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y un segundo sdAb anti-BCMA comprendido en el CAR de la invención comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. Los sdAb anti-BCMA comprendidos en el CAR de la invención pueden comprender un dominio VHH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87 y 80, respectivamente.

10 Como referencia, se divulga un anticuerpo solo de cadena pesada (HCAB) anti-BCMA o una proteína de unión a antígeno que comprende uno cualquiera de los sdAb anti-BCMA descritos anteriormente.

15 15 El CAR de la invención es un receptor de antígeno quimérico para BCMA que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer y un segundo sdAb anti-BCMA como se define en las reivindicaciones; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. El CAR se puede describir como monoespecífico. El CAR se puede describir como multivalente (tal como bivalente o trivalente).

20 20 En algunas realizaciones, el primer sdAb y el segundo sdAb se unen específicamente al mismo epítopo. En algunas realizaciones, el primer sdAb y el segundo sdAb se unen específicamente a diferentes epítopos.

25 En algunas realizaciones según uno cualquiera de los CAR de la invención, el primer sdAb y/o el segundo sdAb son de camélido, quiméricos, humanos o humanizados.

30 En algunas realizaciones según uno cualquiera de los CAR de la invención, el primer sdAb y el segundo sdAb se fusionan directamente entre sí a través de un enlace peptídico. En algunas realizaciones, el primer sdAb y el segundo sdAb se fusionan entre sí a través de un conector peptídico. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 144-151.

35 35 En algunas realizaciones según uno cualquiera de los CAR de la invención, el dominio transmembrana es el de una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana deriva de CD8 o CD28. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 132 o SEQ ID NO: 133.

40 40 En algunas realizaciones según uno cualquiera de los CAR de la invención, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140 o SEQ ID NO: 141.

45 45 En algunas realizaciones según uno cualquiera de los CAR de la invención, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador comprende un dominio citoplasmático de CD28 y/o un dominio citoplasmático de CD137. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 y/o SEQ ID NO: 137.

50 50 En algunas realizaciones según uno cualquiera de los CAR de la invención, el CAR comprende adicionalmente un dominio bisagra localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el dominio bisagra deriva de CD8α. En algunas realizaciones, el dominio bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130.

55 55 En algunas realizaciones, el CAR comprende adicionalmente un péptido señal localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el péptido señal deriva de una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD8α, receptor α de GM-CSF y cadena pesada de IgG1. En algunas realizaciones, el péptido señal deriva de CD8α. En algunas realizaciones, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127.

60 Los CAR de la invención se enumeran en la Tabla 5. Divulgado como referencia en las Tablas 4, 5 y 6, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 152-174, 198-201, 206-216, 248-249 y 257-260. La presente invención proporciona un CAR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 265-270.

Se divulga como referencia un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 76 a 79, 81 a 86, 88 a 100, 152-174, 198-201, 206-216, 248-249 y 257-260. La presente invención proporciona un CAR que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 80, 87 y 265-270.

5 Un aspecto de la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica uno cualquiera de los CAR de la invención. La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre SEQ ID NO: 105, 112 y 271-276. Divulgada como referencia, la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 175-197, 202-205, 217-227, 250-251 y 261-264. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado comprende adicionalmente una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo CAR, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR está conectada operablemente a la segunda secuencia de ácido nucleico a través de una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de autoescisión, tal como un péptido T2A, P2A o F2A. En algunas realizaciones, la tercera secuencia de ácido nucleico es SEQ ID NO: 256. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es una molécula de ADN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es una molécula de ARN.

10 Un aspecto de la presente invención proporciona un vector que comprende los ácidos nucleicos aislados de la invención. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral. En algunas realizaciones, el vector es un vector lentiviral.

15 Un aspecto de la presente invención proporciona una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética, que comprende uno cualquiera de los CAR de la invención o uno cualquiera de los ácidos nucleicos aislados de la invención, o uno cualquiera de los vectores de la invención. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética comprende o expresa dos o más CAR de la invención en donde los dos o más CAR se unen específicamente a diferentes antígenos. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria es una célula T, una célula NK, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente o una célula madre embrionaria. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria es una célula T.

20 Un aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cualquiera de las células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Se proporciona adicionalmente la composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un individuo. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es autóloga. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es alogénica. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer líquido. En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer sólido, tal como glioblastoma.

25 30 35 Un aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los sdAb anti-CD19, sdAb anti-CD20, sdAb anti-CD38 o sdAb anti-BCMA descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, existe un método para tratar una enfermedad (tal como cáncer) en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la composición farmacéutica.

40 45 También se proporcionan usos, kits, y artículos de fabricación que comprenden uno cualquiera de los CAR, células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética, ácidos nucleicos aislados o vectores de la invención. La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Breve descripción de los dibujos

50 La FIG. 1A compara las estructuras de un CAR basado en V_HH y un CAR basado en scFv convencional. La estructura esquemática de la izquierda muestra un CAR monovalente monoespecífico ilustrativo que tiene un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio V_HH. La estructura esquemática de la derecha muestra un CAR monovalente monoespecífico ilustrativo que tiene un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio scFv.

55 La FIG. 1B compara las estructuras de un CAR basado en V_HH que tiene dos sitios de unión a antígeno y un CAR basado en scFv convencional que tiene dos sitios de unión a antígeno. La estructura esquemática a la izquierda es un CAR ilustrativo que tiene un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende dos Dominios V_HH. Los dos dominios V_HH pueden ser iguales o diferentes. La estructura esquemática a la derecha muestra un CAR ilustrativo que tiene un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende dos dominios scFv. Los dos dominios scFv pueden ser iguales o diferentes.

La FIG. 1C muestra estructuras esquemáticas de CAR basados en V_HH bivalentes y biespecíficos ilustrativos.

- 5 La estructura esquemática en el panel superior izquierdo muestra un CAR bivalente monoespecífico ilustrativo que tiene un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende dos dominios V_{HH} idénticos, cada uno de los cuales se une específicamente al epítopo 1 del antígeno A. La estructura esquemática en el panel superior derecho muestra un CAR bivalente monoespecífico ilustrativo que tiene un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer dominio V_{HH} que se une específicamente al epítopo 1 del antígeno A, y un segundo dominio V_{HH} que se une específicamente al epítopo 2 del antígeno A. El epítopo 1 y el epítopo 2 del antígeno A pueden ser diferentes en su estructura y/o secuencia. La estructura esquemática en el panel inferior izquierdo muestra un CAR biespecífico ilustrativo que tiene un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer dominio V_{HH} que se une específicamente al antígeno A, y un segundo dominio V_{HH} que se une específicamente al antígeno B. El antígeno A y el antígeno B son antígenos diferentes.
- 10 La FIG. 1D muestra estructuras esquemáticas de CAR basados en V_{HH} ilustrativos que tienen tres o más dominios V_{HH} . Los CAR pueden tener una pluralidad de dominios V_{HH} fusionados entre sí directamente o a través de conectores peptídicos. Los dominios V_{HH} pueden ser iguales o diferentes. Los dominios V_{HH} diferentes se pueden unir específicamente a epítopos diferentes sobre el mismo antígeno o antígenos diferentes.
- 15 La FIG. 1E muestra células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética ilustrativas que co-expresan dos CAR basados en V_{HH} diferentes. La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética ilustrativa en el panel izquierdo co-expresa dos CAR monovalentes monoespecíficos diferentes. La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética ilustrativa en el panel central co-expresa un CAR monovalente monoespecífico y un CAR bivalente o biespecífico. La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética ilustrativa en el panel derecho co-expresa dos CAR biespecíficos o bivalentes diferentes. Los CAR pueden reconocer diferentes antígenos.
- 20 La FIG. 2A muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células T que expresan CAR monoespecíficos ilustrativos que comprenden diversos anticuerpos de dominio único anti-BCMA (es decir anti-CD269) o anti-CD38 contra la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226.Luc.
- 25 La FIG. 2B muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células T que expresan CAR monoespecíficos ilustrativos que comprenden diversos anticuerpos de dominio único anti-BCMA (es decir, anti-CD269) o anti-CD38 contra la línea celular de glioblastoma U87MG.Luc.
- 30 La FIG. 3A muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células T que expresan CAR biespecíficos ilustrativos contra la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226.Luc.
- 35 La FIG. 3B muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células T que expresan CAR biespecíficos ilustrativos contra la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226.Luc.
- 40 La FIG. 4 muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células T que expresan CAR biespecíficos ilustrativos dirigido a CD19 y CD20, un CAR monoespecífico ilustrativo dirigido a CD19, y un CAR monoespecífico ilustrativo dirigido a CD20.
- 45 La FIG. 6 muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* para diversas células T. El panel superior izquierdo muestra los resultados de células T de control no transducidas. El panel superior derecho muestra los resultados de las células T que expresan un CAR para CD19 ilustrativo. El panel inferior izquierdo muestra los resultados de las células T que expresan un CAR para CD20 ilustrativo. El panel inferior derecho muestra los resultados de las células T que expresan un CAR para CD19 x CD20 biespecífico ilustrativo.
- 50 La FIG. 7 muestra los resultados de un ensayo antitumoral *in vivo* de células T que expresan un CAR biespecífico ilustrativo dirigido a CD19 y CD20.
- 55 La FIG. 8A muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad de células T *in vitro* que expresan CAR bivalentes monoespecíficos ilustrativos contra la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226.Luc. Cada uno de los CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende dos sdAb anti-BCMA diferentes (es decir, anti-CD269).
- 60 La FIG. 8B muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* de células T que expresan CAR bivalentes monoespecíficos ilustrativos contra la línea celular de glioblastoma U87MG.Luc. Cada uno de los CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende dos sdAb Anti-BCMA diferentes (es decir, anti-CD269).

Descripción detallada de la presente invención

La presente invención proporciona un CAR multivalente como se define en las reivindicaciones. A diferencia de los fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, los sdAb sólo contienen un único dominio variable, tal como V_HH. Por tanto, los sdAb son mucho más pequeños de tamaño que los fragmentos

5 de unión a antígeno tales como scFv que se utilizan actualmente como dominios de unión a antígeno extracelulares en los CAR. Asimismo, como no hay necesidad de emparejamiento de la cadena pesada y la cadena ligera durante el 10 plegamiento de los sdAb, el plegamiento incorrecto del dominio de unión a antígeno extracelular puede reducirse en células inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética que expresan CAR basados en sdAb. Los CAR que tienen dominios de unión a antígeno extracelulares que comprenden múltiples copias de un sdAb o múltiples sdAb 15 que se dirigen a diferentes epítopos o antígenos se pueden construir de manera conveniente y producir de manera recombinante, proporcionando de este modo una plataforma eficaz para la preparación y exploración de CAR multivalentes y multiespecíficos. Adicionalmente, la pequeña huella de los sdAb puede permitir el acceso de los CAR 20 a dianas antigenicas ocultas y epítopos en tejidos tumorales.

Los CAR multiespecíficos y multivalentes pueden tener una eficacia mejorada sobre los CAR monovalentes 25 monoespecíficos para inmunoterapia del cáncer. Las células cancerosas son genéticamente inestables, lo que les permite escapar de las terapias dirigidas mutando o perdiendo genes que codifican los antígenos diana. Al dirigirse a dos o más epítopos o antígenos diferentes en células cancerosas, los CAR multivalentes o multiespecíficos pueden hacer más difícil que las células cancerosas escapen completamente del direccionamiento de las células efectoras 30 inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética (tales como células T) que expresan los CAR. Debido a su pequeño tamaño, los anticuerpos de dominio único fusionados en tandem, que se utilizan como dominios de unión a antígeno extracelulares en los CAR multivalentes o multiespecíficos de la presente invención, pueden conservar su integridad estructural individual y afinidad de unión a antígenos diana, permitiendo de este modo la elección como 35 diana eficaz de cada epítopo o antígeno por los CAR. Las células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética que expresan los CAR multivalentes o multiespecíficos o que co-expresan dos o más receptores de antígeno químicos que se dirigen a diferentes antígenos tumorales pueden superar los mecanismos de escape inmunitario del tumor que se deben a anomalías en el procesamiento y la presentación de proteína-antígeno.

Por consiguiente, se divulga como referencia un receptor de antígeno químico (CAR) multiespecífico (tal como biespecífico) que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a un primer antígeno y un segundo anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a un segundo antígeno; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer antígeno es diferente del segundo antígeno. En algunos ejemplos, el primer antígeno es BCMA y el segundo antígeno es CD38. En algunas realizaciones, el primer antígeno es CD19, y el segundo antígeno es BCMA. En algunos ejemplos, el primer antígeno es CD19 y el segundo antígeno es CD20. En algunos ejemplos, el primer antígeno es CD19, y el segundo antígeno es CD22.

35 La presente invención proporciona un receptor de antígeno químico (CAR) multivalente que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer y un segundo anticuerpo de dominio único (sdAb) que se unen específicamente a un antígeno como se define en las reivindicaciones; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular.

40 En otro aspecto, se proporciona un receptor de antígeno químico (CAR) multivalente de la invención que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un primer epítopo de un antígeno, y un segundo anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un segundo epítopo del antígeno; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer epítopo es diferente del segundo epítopo.

45 Adicionalmente se divultan como referencia nuevos anticuerpos de dominio único anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA y anti-CD38 y receptores de antígeno químicos que comprenden uno cualquiera de los sdAb.

También se proporcionan en el presente documento células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética (tales como células T) que comprenden los CAR de la invención, la composición farmacéutica de la invención y la composición farmacéutica de la invención para su uso en métodos de tratamiento del cáncer.

I. Definiciones

50 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro del conocimiento práctico de la técnica, muchos de las cuales se describen a continuación con fines ilustrativos. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, p. ej., Current Protocols in Molecular Biology o Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (2009); Ausubel et al, Short Protocols in Molecular Biology, 3^a ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3^a Edición, 2001); 55 Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Clonación de ADN: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames y S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986);

Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) y otras referencias similares.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de 4 cadenas de longitud completa o anticuerpos solo de cadena pesada de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad polipeptídica, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos, dianticuerpos y moléculas de cadena sencilla), así como fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, F(ab')₂, y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento. Los anticuerpos contemplados en el presente documento incluyen anticuerpos de dominio único, tales como anticuerpos solo de cadena pesada.

La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden de 2 a 5 de las unidades de 4 cadenas básicas que se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes combinados con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L está conectada a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están conectadas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y V_L juntos forman un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, p. ej., Basic and Clinical Immunology, 8^a Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71 y capítulo 6. La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y μ se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H, p. ej., los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "anticuerpo solo de cadena pesada" o "HCAb" se refiere a un anticuerpo funcional, que comprende cadenas pesadas, pero carece de las cadenas ligeras encontradas habitualmente en anticuerpos de 4 cadenas. Se sabe que los animales camélidos (tales como camellos, llamas o alpacas) producen HCAb.

El término "anticuerpo de dominio único" o "sdAb" se refiere a un polipéptido de unión a un solo antígeno que tiene tres regiones determinantes complementarias (CDR). El sdAb solo es capaz de unirse al antígeno sin emparejarse con un polipéptido que contiene CDR correspondiente. En algunos casos, los anticuerpos de dominio único se modifican a partir de HCAb de camélido, y sus dominios variables de cadena pesada se denominan en el presente documento "V_HH". Algunos V_HH también pueden ser conocidos como Nanobodies. El sdAb de camélido es uno de los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno más pequeños conocidos (véanse, p. ej., Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374:168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013)). Un V_HH básico tiene la siguiente estructura del extremo N-terminal al extremo C-terminal: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de complementariedad 1 a 3.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción (p. ej., natural o recombinante). Preferiblemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como el resultante de células transfectadas recombinantes, son materiales que interferirían típicamente en los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará: (1) a más de 95% en peso de anticuerpo como se determina, por ejemplo, mediante el método de Lowry, y en algunas realizaciones, a más de 99% en peso; (1) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que no estará presente al menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Normalmente, sin embargo, se preparará un polipéptido o anticuerpo aislados mediante al menos una etapa de purificación.

La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refieren a los dominios amino terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden denominar "V_H" y "V_L", respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (con relación a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión al antígeno. Los anticuerpos solo de cadena

pesada de las especies de camélido tienen una única región variable de cadena pesada, que se denomina "V_HH". V_HH es por tanto un tipo especial de V_H.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de todo el intervalo de los dominios variables. En su lugar, se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal", como se emplea en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones post-traduccionales (p. ej., isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigenóico. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan por el cultivo de hibridoma o de manera recombinante, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar según la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (p. ej., Kohler y Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véanse, p. ej., Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004) y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes o todos los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, p. ej., los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); Patentes de Estados Unidos Núm. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

El término "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un radical citotóxico o radiomarca.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se utilizan indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, en contraposición a un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos de 4 cadenas de longitud completa incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los anticuerpos solo de cadena pesada de longitud completa incluyen la cadena pesada (tal como V_HH) y una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (p. ej., dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la unión al antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; dianticuerpos; anticuerpos lineales (véanse la Patente de Estados Unidos Núm. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; anticuerpos de dominio único (tales como V_HH), y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). 1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo

produce un único fragmento $F(ab')_2$ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab conectados por disulfuro que tienen diferente actividad de unión a antígeno y que todavía son susceptibles de entrecruzamiento con antígenos. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos restos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_{H1} incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación

5 en el presente documento para Fab' en donde el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi-terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. 10 Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante secuencias en la región Fc, la región que también es reconocida por receptores de Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles 15 cada uno de las cadenas H y L) que contribuyen a los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

"Fv de cadena sencilla" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los 20 dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

Los "fragmentos funcionales" de los anticuerpos descritos en el presente documento comprenden una porción de un 25 anticuerpo intacto, que generalmente incluye la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que retiene o tiene capacidad de unión a FcR modificado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpo lineal, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término dianticuerpos se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv 30 (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de manera que se logra el emparejamiento intercatenario, pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado de este modo un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los dianticuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los dianticuerpos se describen con mayor detalle, 35 por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "químéricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos químéricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos PRIMATTZFD®, en donde la región de unión al antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, p. ej., mediante inmunización de monos macaco con un antígeno de interés. Como se emplea en el presente documento, "anticuerpo humanizado" se utiliza como un subconjunto de "anticuerpos químéricos".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., de camélido) son anticuerpos químéricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de una HVR (definida a continuación en el presente documento) del receptor se sustituyen por restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. 50 En algunos casos, los restos del marco ("FR") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de los al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de restos FR individuales que mejoran el rendimiento del anticuerpo, tales como afinidad de unión, isomerización, inmunogenicidad, etc. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la

FR es típicamente no más de 6 en la cadena H, y en la cadena L, no más de 3. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse, p. ej., Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994) y Patentes de Estados Unidos Núm. 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha preparado utilizando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en la presente memoria. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando diversos mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos métodos descritos por Cole et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pag. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a la exposición antigenica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado, p. ej., xenoratones inmunizados (véase, p. ej., Patentes de Estados Unidos Núm. 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas.

Los términos "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se emplean en el presente documento, se refieren a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que tienen secuencias hipervariables y/o forman bucles definidos estructuralmente. Generalmente, los anticuerpos de dominio único comprenden tres HVR (o CDR): HVR1 (o CDR1), HVR2 (o CDR2) y HVR3 (o CDR3). La HVR3 muestra la mayor diversidad de las tres HVR, y se cree que desempeña un papel único en conferir especificidad fina a los anticuerpos. Véanse, p. ej., Hamers-Caterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996).

Los términos "región determinante de complementariedad" o "CDR" se utilizan para referirse a regiones hipervariables como se define mediante el sistema de Kabat. Véase W. Véase, W. Chem Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991).

Se utilizan varias delineaciones de HVR y se incluyen en el presente documento. Las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizados por el soporte lógico de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Delineaciones de HVR.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender las "HVR extendidas" siguientes: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en V_L y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en V_H . Los restos de dominios variables se numeran según Kabat *et al.*, más arriba, para cada una de estas definiciones.

- 5 Los restos de aminoácidos de un anticuerpo de dominio único (tal como V_H) se numeran según la numeración general para dominios V_H proporcionada por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of immunological interest", Servicio de Salud Pública, NIH Bethesda, Md., Publicación Núm. 91), tal como se aplica a dominios V_H de Camélido en el artículo de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods de 23 de junio de 2000; 240 (1-2): 185-195. Según esta numeración, la FR1 de un V_H comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 1-30, la CDR1 de un V_H comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 31-35, la FR2 de un V_H comprende los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR2 de un V_H comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 50-65, la FR3 de un V_H comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 66-94, la CDR3 de un V_H comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 95-102 y la FR4 de un V_H comprende los restos de aminoácidos en las posiciones 103-113. A este respecto, se debe observar que - como es bien conocido en la técnica para los dominios V_H y para los dominios V_H - el número total de restos de aminoácidos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de restos de aminoácidos indicado por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones según la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más restos de aminoácidos que el número permitido por la numeración de Kabat).
- 20 Las expresiones "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración utilizado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, más arriba. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácidos (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y los restos insertados (p. ej., restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de restos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".
- 25 A menos que se indique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat *et al.*, más arriba. El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU de IgG1 humana.
- 30 Los restos del "marco" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de HVR como se define en el presente documento.
- 35 Un "marco consenso humano" o "marco humano aceptor" es un marco que representa los restos de aminoácidos que se producen más comúnmente en una selección de secuencias del marco de V_L o V_H de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de las secuencias de V_L o V_H de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991). Para V_L , el subgrupo puede ser el subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV como en Kabat *et al.*, más arriba. Adicionalmente, para V_H , el subgrupo puede ser el subgrupo I, subgrupo II o subgrupo III como en Kabat *et al.* Alternativamente, un marco consenso humano puede derivar de lo anterior, donde restos particulares, por ejemplo, cuando se selecciona un resto de marco humano basándose en su homología con el marco donador alineando la secuencia de marco donador con una colección de diversas secuencias del marco humanas. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos.
- 40 Una "modificación de aminoácido" en una posición especificada, p. ej., de la región Fc, se refiere a la sustitución o delección del resto especificado, o la inserción de al menos un resto de aminoácido adyacente al resto especificado.
- 45 La inserción "adyacente" a un resto especificado significa la inserción dentro de uno a dos restos del mismo. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal con respecto al resto especificado. La modificación de aminoácido preferida en el presente documento es una sustitución.
- 50

Un anticuerpo "maduración de la afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa o esas alteraciones. En algunos ejemplos, un anticuerpo con maduración de la afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos con maduración de la afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración de la afinidad mediante barajado de dominios V_H y V_L . La mutagénesis aleatoria de restos de HVR y/o del marco es descrita, por ejemplo, por: Barbas et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7):3310-9 (1995) y Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Como se emplean en el presente documento, los términos "se une específicamente", "reconoce específicamente" o "es específico para" se refieren a interacciones medibles y reproducibles, tales como la unión entre una diana y una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb), que es determinante de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluyen moléculas biológicas. Por ejemplo, una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) que se une específicamente a una diana (que puede ser un epítopo) es una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que aquellas con la que se une a otras dianas. En algunas realizaciones, el grado de unión de una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) a una diana no relacionada es menor que aproximadamente 10% de la unión de la proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) a la diana según se mide, p. ej., mediante un radioinmunoensayo (RIA). En algunas realizaciones, una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$ o $\leq 0,1 \text{nM}$. En algunas realizaciones, una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) se une específicamente a un epítopo en una proteína que se conserva entre la proteína de diferentes especies. En algunas realizaciones, la unión específica puede incluir, pero no requiere unión exclusiva.

El término "especificidad" se refiere al reconocimiento selectivo de una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) para un epítopo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. El término "multiespecífico" como se emplea en el presente documento indica que una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) tiene dos o más sitios de unión a antígeno de los cuales al menos dos se unen a un antígeno diferente o un epítopo diferente del mismo antígeno. "Biespecífico", como se emplea en el presente documento, indica que una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) tiene dos especificidades de unión a antígeno diferentes. El término CAR monoespecífico como se emplea en el presente documento indica una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb) que tiene uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítopo del mismo antígeno.

El término "valente", como se emplea en el presente documento, indica la presencia de un número especificado de sitios de unión en una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb). Un anticuerpo natural, por ejemplo, o un anticuerpo de longitud completa tienen dos sitios de unión y son bivalentes. Como tales, los términos "trivalente", "tetravalente", "pentavalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, tres sitios de unión, cuatro sitios de unión, cinco sitios de unión y seis sitios de unión, respectivamente, en una proteína de unión a antígeno (tal como un CAR o un sdAb).

"Funciones efectoras de anticuerpo" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (p. ej., receptores de células B); y activación de células B. Función efectora de anticuerpo "reducida o minimizada" significa que se reduce en al menos 50% (alternativamente, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) con respecto al anticuerpo de tipo salvaje o no modificado. La determinación de la función efectora de anticuerpo puede ser determinada y medida fácilmente por un experto en la técnica. En un ejemplo preferido, las funciones efectoras de anticuerpo de unión al complemento, citotoxicidad dependiente del complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpos se ven afectadas. En algunos ejemplos, la función efectora se elimina a través de una mutación en la región constante que eliminó la glicosilación, p. ej., "mutación sin efecto". En un aspecto, la mutación sin efecto es una mutación N297A o DANA (D265A+N297A) en la región CH2. Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6591-6604 (2001). Alternativamente, las mutaciones adicionales que dan como resultado la reducción o eliminación de la función efectora incluyen: K322A y L234A/L235A (LALA). Alternativamente, la función efectora se puede reducir o eliminar a través de técnicas de producción, tales como la expresión en células anfítrionas que no glicosilan (p. ej., *E. coli*) o en donde se produce un patrón de glicosilación alterado que es ineficaz o menos eficaz en promover la función efectora (p. ej., Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278(5): 3466-3473 (2003)).

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (p. ej., células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos arman las células citotóxicas y son necesarios para destruir la célula diana mediante este mecanismo. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI,

5 Fc_YRII y Fc_YRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el divulgado por Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

10 El término "región Fc" en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la 15 región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, se define normalmente que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo terminal de la misma. La lisina C-terminal (resto 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante modificación mediante ingeniería genética recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del 20 anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447. Las regiones Fc de secuencia nativa 25 adecuadas para su uso en los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4 humanas.

20 "Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo o un CAR) y su compañero de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se emplea en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno, o CAR y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la 25 constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica una variedad de métodos 30 para medir la afinidad de unión, de los cuales se puede utilizar cualquiera de ellos. Los ejemplos ilustrativos específicos para medir la afinidad de unión se describen a continuación.

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. En algunos ejemplos, los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

35 Un "agonista" o anticuerpo activador es aquel que potencia o inicia la señalización por el antígeno al que se une. En algunas realizaciones, los anticuerpos agonistas causan o activan la señalización sin la presencia del ligando natural.

40 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" y la "homología" con respecto a una secuencia de péptido, polipéptido o anticuerpo se definen como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que es idéntico a los restos de aminoácidos en la secuencia de péptido o polipéptido específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de 45 determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas maneras que están dentro del conocimiento práctico de la técnica, por ejemplo, utilizando soporte lógico informático disponible públicamente tal como soporte lógico BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan.

50 "Receptor de antígeno químérico" o "CAR", como se emplea en el presente documento, se refiere a receptores modificados mediante ingeniería genética, que se pueden utilizar para injertar una o más especificidades de antígeno en células efectoras inmunitarias, tales como linfocitos T. Algunos CAR también se conocen como "receptores artificiales de células T", "receptores químéricos de células T" o "receptores inmunitarios químicos". El CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular específico para uno o más antígenos (tales como antígenos tumorales), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de una célula T y/u otros receptores. "CAR-T" se refiere a una célula T que expresa un CAR.

55 Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un CAR o un sdAb descritos en el presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en el entorno en el que se produjo. Preferiblemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento están en una forma distinta de la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos del presente documento presentes 60 de forma natural en las células.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante conectada operablemente en un organismo anfitrón particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

5 El ácido nucleico está "conectado operablemente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está conectado operablemente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador están conectados operablemente a una secuencia codificante si afectan a la transcripción de la secuencia; 10 o un sitio de unión a ribosoma está conectado operablemente a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilita la traducción. Generalmente, "conectado operablemente" significa que las secuencias de ADN que se están conectando son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La conexión se realiza mediante ligación en sitios de restricción 15 convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

10 El término "vector", como se emplea en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está conectada. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado al genoma de una célula anfitriona en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están conectados operablemente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

20 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término autólogo haga referencia a cualquier material derivado del mismo individuo que posteriormente debe reintroducirse en el individuo.

25 "Alogénico" se refiere a un injerto derivado de un individuo diferente de la misma especie.

25 Los términos "transfектado" o "transformado" o "transducido" como se emplean en el presente documento se refieren a un proceso mediante el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula anfitriona. Una célula "transfектada" o "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula primaria objeto y su progenie.

30 Como se emplea en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente y todas estas designaciones incluyen su progenie. Por tanto, las palabras "transfектantes" y "células transfectadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica que la escrutada en la célula originalmente transformada.

35 Los términos "célula anfitriona", "línea celular anfitriona" y "cultivo de células anfitrionas" se utilizan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de tales células. Las células anfitrionas incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma sin tener en cuenta el número de pasos. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante 40 que tiene la misma función o actividad biológica que la escrutada o seleccionada en la célula originalmente transformada se incluye en el presente documento.

45 Como se emplean en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" representan un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen resultados clínicos. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, disminuir la extensión de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (p. ej., prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la propagación (p. ej., metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado de la enfermedad, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de una o más medicaciones distintas requeridas para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, aumentar la calidad de vida y/o prolongar la supervivencia. También se incluye en "tratamiento" una reducción de la 50 consecuencia patológica del cáncer. Los usos de la presente invención contemplan uno cualquiera o más de estos aspectos de tratamiento.

55 Como se emplean en el presente documento, un "individuo" o un "sujeto" se refieren a un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, humano, bóvido, équido, félido, cánido, roedor o primate. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

55 El término "cantidad eficaz" empleado en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente, tal como un anticuerpo de dominio único, una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética, o una composición farmacéutica de los mismos, suficiente para tratar un trastorno, afección o enfermedad especificados tal como mejorar, paliar, disminuir y/o retrasar uno o más de sus síntomas. En referencia al cáncer, una cantidad eficaz

comprende una cantidad suficiente para provocar que un tumor se contraiga y/o disminuya la tasa de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento tumoral) o para prevenir o retrasar otra proliferación celular no deseada. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para prevenir o retrasar la recurrencia. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones. La cantidad eficaz del fármaco o composición puede: (i) 5 reducir el número de células cancerosas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibir, retrasar, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; (v) inhibir el crecimiento tumoral; (vi) 10 prevenir o retrasar la aparición y/o recurrencia del tumor; y/o (vii) aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

"Entorno adyuvante" se refiere a un entorno clínico en el que un individuo ha tenido antecedentes de cáncer, y generalmente (pero no necesariamente) ha sido sensible a la terapia, que incluye, pero no se limita a, cirugía (p. ej., resección por cirugía), radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, debido a sus antecedentes de cáncer, estos individuos se consideran en riesgo de desarrollo de la enfermedad. El tratamiento o administración en el "entorno adyuvante" se refiere a un modo posterior de tratamiento. El grado de riesgo (p. ej., cuando un individuo en el contexto adyuvante se considera como de "alto riesgo" o "bajo riesgo") depende de varios factores, lo más habitualmente de la extensión de la enfermedad cuando se trata por primera vez.

"Entorno neoadyuvante" se refiere a un entorno clínico en el que el método se lleva a cabo antes de la terapia primaria/definitiva.

20 Como se emplea en el presente documento, "retrasar" el desarrollo del cáncer significa aplazar, impedir, ralentizar, retrasar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad. Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se esté tratando. Como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Un método que retrasa el desarrollo del cáncer es un método que 25 reduce la probabilidad de desarrollo de la enfermedad en un marco de tiempo dado y/o reduce la extensión de la enfermedad en un marco de tiempo dado, en comparación con la no utilización del método. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, utilizando un número estadísticamente significativo de individuos. El desarrollo del cáncer puede detectarse utilizando métodos convencionales, incluyendo, pero sin limitarse a, tomografía axial computarizada (barido TAC), obtención de Imágenes por Resonancia Magnética (IRM), ultrasonidos abdominales, 30 pruebas de coagulación, arteriografía o biopsia. El desarrollo también puede referirse a la progresión del cáncer que puede ser inicialmente indetectable e incluye la aparición, recurrencia y comienzo.

35 El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Tales formulaciones son estériles. Una formulación "estéril" es aséptica o está libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

40 "Portadores", como se emplea en el presente documento, incluye vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se está exponiendo a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos 45 tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraíones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

50 El "diluyente" de interés en el presente documento es aquel que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Los diluyentes ilustrativos incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyectables ("BWFI en sus siglas en inglés"), una solución de pH tamponado (p. ej., solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. En una realización alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

55 Un "conservante" es un compuesto que puede añadirse a las formulaciones del presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede facilitar, por ejemplo, la producción de una formulación multiuso (dosis múltiple). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen 60

alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es el alcohol bencílico.

- 5 Una formulación estable es aquella en la que la proteína conserva esencialmente su estabilidad e integridad física y química tras el almacenamiento. En la técnica están disponibles diversos mecanismos analíticos para medir la estabilidad de las proteínas y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drugs Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Para un escrutinio rápido, la formulación se puede mantener a 40°C durante 2 semanas a 1 mes, momento en el cual se mide la estabilidad.
- 10 Cuando la formulación se va a almacenar a 2-8°C, la formulación debe ser generalmente estable a 30°C o 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8°C durante al menos 2 años. Cuando la formulación se va a almacenar a 30°C, generalmente la formulación debe ser estable durante al menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento se puede utilizar como un indicador de estabilidad de proteínas. Por tanto, una formulación "estable" puede ser aquella en donde menos de 15 aproximadamente 10% y preferiblemente menos de aproximadamente 5% de la proteína está presente como agregado en la formulación. En otras realizaciones, se puede determinar cualquier aumento en la formación de agregados durante el almacenamiento de la formulación.

Una formulación reconstituida es aquella que ha sido preparada disolviendo una formulación liofilizada de proteína o anticuerpo en un diluyente de tal manera que la proteína se dispersa por toda ella. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (p. ej., administración subcutánea) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés y, en algunas realizaciones de la presente invención, puede ser una que sea adecuada para la administración parenteral o intravenosa.

20 Una formulación isotónica es aquella que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónica" describe una formulación con una presión osmótica inferior a la de la sangre humana. De manera correspondiente, el término "hipertónica" se utiliza para describir una formulación con una presión osmótica superior a la de la sangre humana. La isotonicidad se puede medir utilizando un osmómetro de presión de vapor o de tipo congelación con hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

25 30 Se entiende que las realizaciones de la presente invención proporcionadas en el presente documento incluyen realizaciones "que consisten" y/o "que consisten esencialmente en".

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

35 Como se emplea en el presente documento, la referencia a "no" un valor o parámetro significa y describe "distinto de" un valor o parámetro. Por ejemplo, el método no se utiliza para tratar cáncer de tipo X significa que el método se utiliza para tratar cáncer de tipos distintos de X.

El término "aproximadamente X-Y" utilizado en el presente documento tiene el mismo significado que "de aproximadamente X a aproximadamente Y".

40 45 Como se emplean en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

II. Anticuerpos de dominio único

En el presente documento se divultan como referencia anticuerpos de dominio único, fragmentos de unión a antígeno de los mismos y proteínas de unión a antígeno que comprenden uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único. Los anticuerpos de dominio único ilustrativos se enumeran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Anticuerpos de dominio único ilustrativos.

Ab	SEQ ID AA ilustr.	SEQ ID AN ilustr.	CDR1	CDR2	CDR3
Anticuerpos de dominio único anti-CD19 ilustrativos					
VHH CD19	76	101	INRMG (SEQ ID NO: 1)	SITVRGITNYADSVKG (SEQ ID NO: 2)	VSSNRDPDY (SEQ ID NO: 3)
Anticuerpos de dominio único anti-CD20 ilustrativos					
VHH CD20	77	102	IGTMG (SEQ ID NO: 4)	AIRWSTGGTRYADS VKG (SEQ ID NO: 5)	DRLSLDLSGRYHYN PAVYDY (SEQ ID NO: 6)
Anticuerpos de dominio único anti-BCMA ilustrativos					
269A37346	78	103	SGFTLDYYAIG (SEQ ID NO: 7)	CISRSDGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 18)	AGADCSGYLRDYEF (SEQ ID NO: 29)
269A37348	79	104	SGRTFSTYGM (SEQ ID NO: 8)	SKASMNYSGRTYY ADSVKG (SEQ ID NO: 19)	AGTGCSTYGCFDAQ IIDY (SEQ ID NO: 30)
269A37917	80	105	SGRTFTMG (SEQ ID NO: 9)	AISLSPTLAYYAESVKG (SEQ ID NO: 20)	ADRKSVMMSIRPDY (SEQ ID NO: 31)
269A37355	81	106	SGGIFVINAMG (SEQ ID NO: 10)	SIRGLGRTNYDDSVKG (SEQ ID NO: 21)	VYVTLLGGVNRDY (SEQ ID NO: 32)
269A37915	82	107	SGRTFSSIVMG (SEQ ID NO: 11)	AIMWNDGITYLQDS VKG (SEQ ID NO: 22)	ASKGRYSEY (SEQ ID NO: 33)
269A37936	83	108	SGFTFDRAVIV (SEQ ID NO: 12)		

ES 2 984 851 T3

Anticuerpos de dominio único anti-BCMA ilustrativos					
				FIKPSDGTIYYIDS LK G (SEQ ID NO: 23)	ASPEDWYTDWIDW SIYR (SEQ ID NO: 34)
269A37953	84	109	STYTVNSDVM G (SEQ ID NO: 13)	AIMWNDGITYLQDS VKG (SEQ ID NO: 24)	ASKGRYSEY EY (SEQ ID NO: 35)
269A37965	85	110	SGATLTNDHM A (SEQ ID NO: 14)	AIDWSGRTTNYADP VEG (SEQ ID NO: 25)	VLRAWISYDNDY (SEQ ID NO: 36)
269A37972	86	111	SGGTL SKNTVA (SEQ ID NO: 15)	SITWDGRTTYYADS VKG (SEQ ID NO: 26)	DLGKWPAGPADY (SEQ ID NO: 37)
269A37353	87	112	SEHTFSSHVMG (SEQ ID NO: 16)	VIGWRDISTSYADS VKG (SEQ ID NO: 27)	ARRIDAADFDS (SEQ ID NO: 38)
269A37948	88	113	SGRAFSTYFMA (SEQ ID NO: 17)	GLAWSGGSTAYADS	SRGIEVEEFGA (SEQ ID NO: 39)
				VKG (SEQ ID NO: 28)	
Anticuerpos de dominio único anti-CD38 ilustrativos					
38A37333	89	114	SGLTFSSYPMM (SEQ ID NO: 40)	RIS DSGGYTNYDDS VKG (SEQ ID NO: 52)	ILGLPT (SEQ ID NO: 64)
38A37336	90	115	SGFTFSSNWM Y (SEQ ID NO: 41)	TISTDGRGTYYKDS VKG (SEQ ID NO: 53)	KEPRVLMAYLRNLG DFGS (SEQ ID NO: 65)
38A37699	91	116	SGRIF SINAMG (SEQ ID NO: 42)		LNFPYYVY (SEQ ID NO: 66)

ES 2 984 851 T3

Anticuerpos de dominio único anti-CD38 ilustrativos					
				AISTAGSTNYGDSVK KG (SEQ ID NO: 54)	
38A37331	92	117	SGSIFKVFRVF AMS (SEQ ID NO: 43)	SISSGETTYADSVKG (SEQ ID NO: 55)	ADHTFTGDF (SEQ ID NO: 67)
38A37717	93	118	TGKVFSIYDMG (SEQ ID NO: 44)	EITSSGTTHYDDFVSG (SEQ ID NO: 56)	NHVFGGSY (SEQ ID NO: 68)
38A37719	94	119	SASIFTRLPMG (SEQ ID NO: 45)	GIVPSGRINYADSVKG (SEQ ID NO: 57)	ADTFPLPT (SEQ ID NO: 69)
38A37330	95	120	SGRAYATMA (SEQ ID NO: 46)	HLRVSGDTTYYTDSVKG (SEQ ID NO: 58)	GPYGILAAARVSNP GNYDY (SEQ ID NO: 70)
38A37334	96	121	SGLTFSSYIMG (SEQ ID NO: 47)	EISSGGMTSYADSVKG (SEQ ID NO: 59)	APERGSIWYSRYEY KY (SEQ ID NO: 71)
38A37730	97	122	SQGIFTINAMG (SEQ ID NO: 48)	EVSSGGRTDYADSVKG (SEQ ID NO: 60)	VSGWHVFVGDRIV (SEQ ID NO: 72)
38A37340	98	123	SGRTFSSYAMA (SEQ ID NO: 49)	SISTSGGITDYADSVKG (SEQ ID NO: 61)	ARTWYLRTSLQYDY Y (SEQ ID NO: 73)
38A37731	99	124	SGTIVSISTMG (SEQ ID NO: 50)	TITRRGRTNYTDSVK KG (SEQ ID NO: 62)	AEVQLDIWASAYDY (SEQ ID NO: 74)
38A37326	100	125	SGRTYAMG (SEQ		AGKWFPAANEY (SEQ ID

Anticuerpos de dominio único anti-CD38 ilustrativos				
		ID NO: 51)	TISGAGNTKYADSV KG (SEQ ID NO: 63)	NO: 75)

(* = sdAb comprendido en el CAR de la invención. Otros sdAb se divultan como referencia).

Anticuerpos de dominio único anti-BCMA

En el presente documento se divultan como referencia anticuerpos de dominio único aislados que se unen específicamente a BCMA, tal como BCMA humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA modula la actividad de BCMA. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA es un anticuerpo antagonista.

El antígeno maduro de células B (BCMA), también conocido como CD269, es un miembro de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral, concretamente TNFRSF17 (Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192 (1): 129-135, 2000). El BCMA humano se expresa casi exclusivamente en células plasmáticas y células de mieloma múltiple (véanse p. ej., Novak et al., Blood, 103(2): 689-694, 2004; Neri et al., Clinical Cancer Research, 73(19):5903-5909; Felix et al., Mol. Oncology, 9(7): 1348-58, 2015). El BCMA puede unirse al factor activador de células B (BAFF) y a un ligando inductor de proliferación (APRIL) (p. ej., Mackay et al., 2003 y Kalled et al., Immunological Review, 204: 43-54, 2005). El BCMA puede ser una diana de antígeno tumoral adecuada para agentes inmunoterapéuticos contra el mieloma múltiple. Los anticuerpos de alta afinidad pueden bloquear la unión entre BCMA y sus ligandos nativos BAFF y APRIL. Los anticuerpos de dominio único anti-BCMA se pueden utilizar en combinación con inmunoterapia celular utilizando células CAR-T, por ejemplo, para potenciar efectos citotóxicos contra células tumorales.

En el CAR de la invención, hay un anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80. En el CAR de la invención, también hay un anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA es de camélido. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

Como referencia, se divulga un anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende al menos una, al menos dos o las tres CDR seleccionadas entre (a) una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 7, 8, 10-15 y 17; (b) una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 18, 19, 21-26 y 28; y (c) una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 29, 30, 32-37 y 39. En algunos ejemplos, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA es de camélido. En algunos ejemplos, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA está humanizado. En algunos ejemplos, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano. Los sdAb anti-BCMA incluidos en el CAR de la invención comprenden una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o 16, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 27 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o 38, respectivamente. El sdAb anti-BCMA puede ser de camélido. El sdAb anti-BCMA se puede humanizar. El sdAb anti-BCMA puede comprender un marco humano, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

Se divulga como referencia un anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende tres CDR que comprenden: (a) una CDR1 que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 7-17; (b) una CDR2 que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 18-28; y (c) una CDR3 que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de identidad de secuencia de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 29-39. En algunos ejemplos, una CDR que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservativas), inserciones o delecciones con relación a la secuencia de referencia, pero el anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a BCMA. En algunos ejemplos, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA presenta maduración de la afinidad. En algunos ejemplos, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA es de camélido. En algunos ejemplos, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA está humanizado. En algunos ejemplos, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

El CAR de la invención comprende un segundo anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende tres CDR que comprenden: (a) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (b) una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y (c) una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA es de camélido.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

El CAR de la invención comprende un primer anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende tres CDR que comprenden: (a) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; (b) una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; y (c) una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA es de camélido. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA está humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende un marco humano aceptor, p. ej., un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano.

10 15 El sdAb anti-BCMA incluido en el CAR de la invención puede comprender un dominio $V_{H}H$ que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 80 y 87. En algunas realizaciones, una secuencia de $V_{H}H$ que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservativas), inserciones o delecciones con relación a la secuencia de referencia, pero el anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a BCMA. En algunas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 80 y 87. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o delecciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 80 y 87, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

20 25 En algunas realizaciones, un segundo anticuerpo de dominio único anti-BCMA incluido en el CAR de la invención comprende un dominio $V_{H}H$ que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80. En algunas realizaciones, un segundo polipéptido incluido en el CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80. En algunas realizaciones, un primer anticuerpo de dominio único anti-BCMA incluido en el CAR de la invención comprende un dominio $V_{H}H$ que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87. En algunas realizaciones, un primer polipéptido incluido en el CAR de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87.

30 35 En algunos ejemplos, los epítopos funcionales pueden mapearse mediante barrido combinatorio de alanina. En este procedimiento, se puede utilizar una estrategia combinatoria de barrido de alanina para identificar aminoácidos en la proteína BCMA que son necesarios para la interacción con anticuerpos de dominio único anti-BCMA. En algunos ejemplos, el epítopo es conformacional y la estructura cristalina del anticuerpo de dominio único anti-BCMA unido a BCMA se puede emplear para identificar los epítopos. En algunos ejemplos, hay un anticuerpo que se une específicamente al mismo epítopo que cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-BCMA proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, en algunos ejemplos, hay un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 78-88.

40 45 Se divulga como referencia un anticuerpo anti-BCMA, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a BCMA competitivamente con uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-BCMA descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, la unión competitiva se puede determinar utilizando un ensayo ELISA. Por ejemplo, en algunos ejemplos, hay un anticuerpo que se une específicamente a BCMA competitivamente con un anticuerpo de dominio único anti-BCMA que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 78-88.

50 55 Se divulga como referencia un anticuerpo anti-BCMA o una proteína de unión a antígeno que comprende uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-BCMA descritos anteriormente. En algunos ejemplos, el anticuerpo anti-BCMA es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo de camélido, químérico, humanizado o humano. En algunos ejemplos, el anticuerpo anti-BCMA es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un fragmento $V_{H}H$. En algunos ejemplos, el anticuerpo anti-BCMA es un anticuerpo solo de cadena pesada de longitud completa que comprende una región Fc de cualquier clase de anticuerpo o isotipo, tal como IgG1 o IgG4. En algunos ejemplos, la región Fc tiene una función efectora reducida o minimizada.

Un anticuerpo anti-BCMA (tal como un anticuerpo de dominio único anti-BCMA) o una proteína de unión a antígeno divulgados en la presente memoria como referencia pueden incorporar cualquiera de las características, individualmente o combinadas, como se describe en las Secciones 1-7 de "Características de anticuerpos" más adelante.

- 5 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos de dominio único anti-BCMA comprendidos en el CAR de la invención. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de dominio único anti-BCMA en donde el ácido nucleico comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 105 y 112. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 105 y 112. En algunas realizaciones, se proporciona un vector (p. ej., vector de expresión) que comprenden tal ácido nucleico. En algunas realizaciones, se proporciona una célula anfítriona que comprende tal ácido nucleico. Se divulga un método para preparar un anticuerpo anti-BCMA en donde el método comprende cultivar una célula anfítriona que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-BCMA, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-BCMA, y opcionalmente recuperar el anticuerpo anti-BCMA de la célula anfítriona (o medio de cultivo de la célula anfítriona). Las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 103, 104, 106-111 y 113 se divulan en el presente documento como referencia.

Características de los anticuerpos

20 1. Afinidad del anticuerpo

En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{nM}$, $\leq 10 \text{nM}$, $\leq 1 \text{nM}$, $\leq 0,1 \text{nM}$, $\leq 0,01 \text{nM}$, o $\leq 0,001 \text{nM}$ (p. ej., 10^{-8} M o menos, p. ej., de 10^{-8} M a 10^{-13} M , p. ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

La K_d se puede medir mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab o fragmento $V_{H}H$ de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe en el siguiente ensayo. Por ejemplo, la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de Antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, p. ej., Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER[®] (Thermo Scientific) durante la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc Núm.269620), se mezcla antígeno-[^{125}I] 100 pM o 26 pM con diluciones seriadas de un Fab de interés (p. ej., compatible con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incuba después durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (p. ej., aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (p. ej., durante una hora). La solución se retira después y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1% (TWEEN-20[®]) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 μl /pocillo de líquido de centelleo (MICROSCINT-20[™] Packard) y las placas se someten a recuento en un contador gamma TOPCOUNT[™] (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos de o igual al 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

La K_d se puede medir utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando BIACORE[®]-2000 o BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con Hidrocloruro de *N*-etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones seriadas al doble de Fab o $V_{H}H$ del anticuerpo de interés (0,78 nM a 500 nM) en tensioactivo PBS con polisorbato 20 al 0,05% (TWEEN-20[™]) (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (BIACORE[®] Soporte lógico de Evaluación versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la razón k_{off}/k_{on} . Véase, p. ej., Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación se puede determinar utilizando una técnica de extinción de la fluorescencia que mide el aumento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO de serie la 8000[™] (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpos

El CAR de la invención comprende sdAb que comprende cada uno un VH.

En algunos ejemplos, un anticuerpo divulgado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, V_{HH}, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al. *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véanse, p. ej., Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pág. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.571.894 y 5.587.458. Para la discusión de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítopo de unión a receptor de rescate y que tienen una mayor semivida in vivo, véase Patente de Estados Unidos Núm. 5.869.046.

Los dianticuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los trianticuerpos y tetraanticuerpos también son descritos por Hudson et al., en *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción por células anfitrionas recombinantes (p. ej., *E. coli* o fago), como se describe en la presente memoria.

3. Anticuerpos químéricos y humanizados

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo químérico. Se describen ciertos anticuerpos químéricos, p. ej., en Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984). En un ejemplo, un anticuerpo químérico comprende una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de una especie de camélido, tal como llama) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo químérico es un anticuerpo "de clase cambiada" en el que la clase o subclase se han cambiado con respecto a la del anticuerpo parental. Los anticuerpos químéricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En algunas realizaciones, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para los seres humanos, mientras que conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., las CDR (o porciones de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por los restos correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que derivan los restos de HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para fabricarlos son revisados, p. ej., por Almagro y Fransson, en *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y son descritos adicionalmente, p. ej., por Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); Patentes de Estados Unidos Núm. 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmire et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe "técnicas de reconstrucción de la superficie"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe "barajado de FR"); y Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el barajado aleatorio de FR).

Las regiones marco humanas que se pueden utilizar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones marco seleccionadas utilizando el método de "mejor ajuste" (véase, p. ej., Sims et al. *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)); regiones marco derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véanse, p. ej., Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones marco de línea germinal humana (véase, p. ej., Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco derivadas del escrutinio de bibliotecas de FR (véanse, p. ej., Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 (1997) y Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

En algunas realizaciones, los anticuerpos de dominio único se modifican, por ejemplo, se humanizan, sin disminuir la afinidad nativa del dominio por el antígeno y mientras se reduce su inmunogenicidad con respecto a una especie heteróloga. Por ejemplo, los restos de aminoácidos del dominio variable de anticuerpo (V_{HH}) de un anticuerpo de llama se pueden determinar, y uno o más de los aminoácidos de Camélido, por ejemplo, en las regiones marco, se reemplazan por su homólogo humano como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin que ese polipéptido pierda su carácter típico, es decir, la humanización no afecta significativamente la capacidad de unión al antígeno del polipéptido resultante. La humanización de anticuerpos de dominio único de Camélido requiere la introducción y mutagénesis de una cantidad limitada de aminoácidos en una sola cadena polipeptídica. Esto contrasta con la humanización de scFv, Fab', (Fab')₂ e IgG, que requiere la introducción de cambios de aminoácidos en dos cadenas, la cadena ligera y la pesada y la preservación del ensamblaje de ambas cadenas.

Los anticuerpos de dominio único que comprenden un dominio $V_{H}H$ se pueden humanizar para que tengan secuencias de tipo humano. En algunas realizaciones, las regiones FR del dominio $V_{H}H$ utilizado en el presente documento comprenden al menos aproximadamente uno cualquiera de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de homología de secuencia de aminoácidos con regiones marco de V_{H} humano. Una clase ilustrativa de dominios $V_{H}H$ humanizados 5 se caracteriza porque los $V_{H}H$ portan un aminoácido del grupo que consiste en glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, treonina, aspárragina o glutamina en la posición 45, tal como, por ejemplo, L45 y un triptófano en la posición 103, según la numeración de Kabat. Como tales, los polipéptidos que pertenecen a esta clase muestran una alta homología de secuencia de aminoácidos con las regiones 10 marco de V_{H} humano y dichos polipéptidos se podrían administrar a un ser humano directamente sin esperar una respuesta inmunitaria no deseada de las mismas, y sin la carga de humanización adicional.

Otra clase ilustrativa de anticuerpos humanizados de dominio único de camélido se ha descrito en el documento WO 03/035694 y contiene restos hidrófobos de FR2 encontrados típicamente en anticuerpos convencionales de origen humano o de otras especies, pero compensando esta pérdida de hidrofilia por el resto de arginina cargado en la posición 103 que sustituye al resto de triptófano conservado presente en V_{H} a partir de anticuerpos de doble cadena. 15 Como tales, los péptidos que pertenecen a estas dos clases muestran una alta homología de secuencia de aminoácidos con las regiones marco de V_{H} humano y dichos péptidos podrían administrarse a un ser humano directamente sin esperar una respuesta inmunitaria no deseada de las mismas, y sin la carga de humanización adicional.

4. Anticuerpos humanos

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir 20 utilizando diversos mecanismos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos son descritos generalmente por van Dijk y van de Winkel, en *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008). Los ratones o ratas transgénicos capaces de producir anticuerpos de dominio único completamente humanos 25 son conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., los documentos US20090307787A1, Patente de Estados Unidos Núm. 8.754.287, US20150289489A1, US20100122358A1 y WO2004049794.

Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigenica. Tales animales contienen típicamente todo o una porción de los loci de inmunoglobulina humana, que reemplazan los loci de inmunoglobulina endógena, o que están presentes 30 extracromosómicamente o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógena generalmente se han inactivado. Para una revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; Patente de Estados Unidos Núm. 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®, la Patente de 35 Estados Unidos Núm. 7.041.870 que describe tecnología K-M MOUSE®, y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales se pueden modificar adicionalmente, p. ej., mediante combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también se pueden preparar mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito 40 líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Véanse, p. ej., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridoma de células B humanas también son descritos por Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos 45 adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Núm. 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas de humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de Trioma) también es descrita por Vollmers y Brandlein, en *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, en *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

Los anticuerpos humanos también se pueden generar aislando secuencias de dominio variable de clones de F_v seleccionadas entre bibliotecas de presentación en fagos obtenidas de seres humanos. Tales secuencias de dominio variable se pueden combinar después con un dominio constante humano deseado. A continuación, se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de anticuerpos.

Una técnica para obtener secuencias de $V_{H}H$ dirigidas contra un antígeno o diana particulares implica inmunizar 55 adecuadamente un mamífero transgénico que es capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para originar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra dicho antígeno o diana), obteniendo una muestra biológica adecuada de dicho mamífero transgénico que contiene (secuencias de ácido nucleico que codifican) dichas secuencias de $V_{H}H$ (tales como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de células B), y después generar secuencias de $V_{H}H$ dirigidas contra dicho antígeno o diana, partiendo de dicha 60

muestra, utilizando cualquier técnica adecuada conocida per se (tal como cualquiera de los métodos descritos en el presente documento o una técnica de hibridoma). Por ejemplo, para este propósito, se pueden utilizar los ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritos en los documentos WO 02/085945, WO 04/049794 y WO 06/008548 y por Janssens et al., en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 10 de octubre de

5 2006; 103(41):15130-5. Por ejemplo, tales ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada pueden expresar anticuerpos de cadena pesada con cualquier dominio variable (único) adecuado, tales como dominios variables (únicos) de fuentes naturales (p. ej., dominios variables humanos (únicos), dominios variables de Camélido (únicos) o dominios variables de tiburón (únicos)), así como por ejemplo dominios variables sintéticos o semisintéticos (únicos).

5. Anticuerpos derivados de bibliotecas

10 Los anticuerpos se pueden aislar mediante escrutinio de bibliotecas combinatorias en busca de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la técnica una variedad de métodos para generar bibliotecas de presentación en fagos y escrutar tales bibliotecas en busca de anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Tales métodos son revisados, p. ej., por Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., *Human Press*, Totowa, NJ, 2001) y adicionalmente descritos, p. ej., por 15 McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., *Human Press*, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004). Se han descrito métodos para construir bibliotecas de anticuerpos de dominio único, por ejemplo, véase la Patente de 20 Estados Unidos Núm. 7371849.

En ciertos métodos de presentación en fagos, se clonian por separado repertorios de genes de V_H y V_L mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que después se pueden escrutar en busca de fagos de unión a antígeno como describen Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos presentan típicamente fragmentos de anticuerpo, ya sea como fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio no expuesto previamente puede clonarse (p. ej., a partir de ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como describen Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas no expuestas previamente también se pueden preparar sintéticamente 25 clonando segmentos de genes V no reorganizados de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la reorganización *in vitro*, como describen Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen 30 bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la Patente de Estados Unidos Núm. 5.750.373 y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 35 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en el presente documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

40 Un anticuerpo puede ser un anticuerpo multiespecífico, p. ej., un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. Una de las especificidades de unión puede ser para un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD20, BCMA y CD38, y la otra es para cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD20, BCMA y CD38. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un antígeno seleccionado del 45 grupo que consiste en CD19, CD20, BCMA y CD38.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos. Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), documento WO 93/08829 y Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991) y modificación mediante ingeniería genética de "botón en ojal" (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden preparar modificando mediante ingeniería genética los efectos de la atracción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); entrecruzando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.676.980 y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); utilizando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, p. ej., Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); utilizando 50 tecnología de "dianticuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, p. ej., Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993); y utilizando dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv) (véase, p. ej., Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como describen, p. ej., Tutt et al. en *J. Immunol.* 147: 60 (1991); y creando polipéptidos que comprenden anticuerpos de dominio único en tándem (véanse, p. ej., la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20110028695; y Conrath et al. *J. Biol.* 2001;

276(10):7346-50). Los anticuerpos modificados genéticamente con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos Octopus", también se incluyen en el presente documento (véase, p. ej., el documento US 2006/0025576A1).

7. Variantes de anticuerpos

- 5 En algunas realizaciones, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos 10 del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, p. ej., unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

- 15 En algunas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis por sustitución incluyen las FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 3 bajo el encabezamiento de "Sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 3 bajo el encabezamiento de "sustituciones ilustrativas", y como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos pueden escrutar para determinar una actividad deseada, p. ej., unión a antígeno conservada/mejorada, menor inmunogenicidad o mejores ADCC o CDC.

20 TABLA 3. Sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden agruparse según propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 5 (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) alcalinos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 10 Un tipo de variante sustitutiva implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (p. ej., un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para un estudio adicional tendrán modificaciones (p. ej., mejoras) en ciertas propiedades biológicas (p. ej., mayor afinidad, menor inmunogenicidad) con relación al anticuerpo parental y/o habrán conservado sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo parental. Una variante de sustitución ilustrativa es un anticuerpo con maduración de la afinidad, que se puede generar convenientemente, p. ej., utilizando técnicas de maduración de afinidad basadas en la presentación en fagos tales como las descritas en el presente documento. Brevemente, se pueden mutar uno o más restos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se escrutan para determinar una actividad biológica particular (p. ej., afinidad de unión).
- 15 Se pueden realizar alteraciones (p. ej., sustituciones) en HVR, p. ej., para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de HVR, es decir, restos codificados por codones que experimentan mutación con una alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, p. ej., Chowdury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008) y/o SDR (a-CDR), sometiéndose a prueba la variante V_H o V_L resultante para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de la afinidad mediante construcción y reselección de bibliotecas secundarias, p. ej., Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunos ejemplos de maduración de la afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (p. ej., PCR propensa a error, barajado de cadenas o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). A continuación, se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca se escruta después para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos por HVR, en los que varios restos de HVR (p. ej., 4-25 6 restos a la vez) se distribuyen aleatoriamente. Los restos de HVR implicados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, p. ej., utilizando mutagénesis o modelado mediante barrido de alanina. A menudo se seleccionan como diana CDR-H3 y CDR-L3 en particular.
- 30 En algunos ejemplos, se pueden producir sustituciones, inserciones o delecciones dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, las alteraciones conservativas (p. ej., sustituciones conservativas proporcionadas en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión se pueden realizar en las HVR. Tales alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de las HVR o las CDR. En algunos ejemplos de las secuencias de V_H variantes, cada HVR o bien no está alterada, o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.
- 35 Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden ser elegidos como diana para mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como describen Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, un resto o grupo de restos diana (p. ej., restos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) se identifican y reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (p. ej., alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno está afectada. Se pueden introducir sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales.

Alternativamente, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y restos vecinos pueden ser elegidos como diana o eliminados como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden escrutar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

- 5 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales cuya longitud varía de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (p. ej., para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

10 **b) Variantes de glicosilación**

En algunas realizaciones, el anticuerpo se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo está glicosilado. La adición o deleción de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede llevarse a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o retiren uno o más sitios de glicosilación.

- 15 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato anclado a la misma se puede alterar. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenario ramificado que generalmente está anclado mediante una conexión N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, p. ej., Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, p. ej., manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa anclada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenario. En algunas realizaciones, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo con el fin de crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

- 20 Las variantes de anticuerpo pueden tener una estructura de carbohidrato que carece de fucosa anclada (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1% a 80%, de 1% a 65%, de 5% a 65% o de 20% a 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con relación a la suma de todas las glicoestructuras ancladas a Asn 297 (p. ej., estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa) medidas por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de aspárragina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente ± 3 aminoácidos aguas arriba o aguas abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. 25 Tales variantes de fucosilación pueden tener función ADCC mejorada. Véanse, p. ej., las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosiladas" o "con deficiencia de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 30 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 35 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 con deficiencia de fucosilación de proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Solicitud de patente de Estados Unidos Núm. US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11), y 40 líneas celulares de inactivación genética, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con inactivación génica (véase, p. ej., Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y documento WO2003/085107).

- 45 Las variantes de anticuerpos se proporcionan adicionalmente con oligosacáridos bisectados, p. ej., en los que un oligosacárido biantenario anclado a la región Fc del anticuerpo biseca GlcNAc. Tales variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de tales variantes de anticuerpos, p. ej., en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); la Patente de Estados Unidos Núm. 6.602.684 (Umana et al. y el documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido anclado a la región Fc. Tales variantes de anticuerpos pueden tener función CDC mejorada. Se describen tales variantes de anticuerpos, p. ej., en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

50 **c) Variantes de la región Fc**

- 55 Se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (p. ej., una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

Una variante de anticuerpo puede poseer algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo

ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente carece de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, células NK, expresan Fc(RIII) solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI), Fc(RII) y Fc(RIII). La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Ann. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.500.362 (véase, p. ej., Hellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, *Ensayo de citotoxicidad no radiactivo para citometría de flujo ACTI™* (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y *Ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96®* (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el divulgado por Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Véase, p. ej., ELISA de unión a C1q y C3c en dos documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101: 1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Las determinaciones de la Unión a FcRn y el aclaramiento/semivida *in vivo* también se pueden realizar utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12): 1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de Estados Unidos Núm. 6.737.056). Tales mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (Patente de Estados Unidos Núm. 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véanse, p. ej., Patente de Estados Unidos Núm. 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

Una variante de anticuerpo puede comprender una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, p. ej., sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de restos).

Se pueden realizar alteraciones en la región Fc que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), p. ej., como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.194.551, el documento WO 99/51642 y Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Los anticuerpos con semivididas aumentadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Tales variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, p. ej., sustitución del resto 434 de la región Fc (Patente de Estados Unidos Núm. 7.371.826).

Véase también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente de Estados Unidos Núm. 5.648.260; Patente de Estados Unidos Núm. 5.624.821; y documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpos modificados mediante ingeniería genética con cisteína

En algunas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados mediante ingeniería genética con cisteína, p. ej., "TioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo están sustituidos por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos restos por cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan de ese modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros radicales, tales como radicales de fármaco o radicales de conector-fármaco, para crear un producto inmunoconjungado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En algunas realizaciones, se pueden sustituir por cisteína uno cualquiera o más de los siguientes restos: A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos modificados mediante ingeniería genética con cisteína se pueden generar como se describe, p. ej., en Patente de Estados Unidos Núm. 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpos

En algunas realizaciones, el anticuerpo se puede modificar adicionalmente para contener radicales no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los radicales adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de 5 polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de 10 óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p. ej., glicerol), poli(alcohol vinílico), y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros 15 anclados al anticuerpo puede variar, y si se ancla más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se pueden determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado de anticuerpo se utilizará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En algunas realizaciones, existen productos conjugados de un anticuerpo y un radical no proteináceo que pueden 20 calentarse selectivamente por exposición a radiación. En algunas realizaciones, el radical no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan las células ordinarias, pero que calientan el radical no proteináceo a una temperatura a la que se destruyen las células proximales al radical no proteináceo de anticuerpo.

Métodos de preparación

Los anticuerpos (tales como anticuerpos de dominio único) descritos en el presente documento se pueden preparar 25 utilizando cualquier método conocido en la técnica o como se describe en el presente documento.

Se han descrito métodos para preparar anticuerpos de dominio único. Véase, por ejemplo, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 2014; 9(3): 674. Los anticuerpos de dominio único (tales como V_HH) se pueden obtener utilizando métodos conocidos en la técnica tales como inmunización de especies de *Camélido* (tales como camello o llama) y obtención 30 de hibridomas a partir de los mismos, o mediante clonación de una biblioteca de anticuerpos de dominio único utilizando mecanismos de biología molecular conocidos en la técnica y selección posterior mediante ELISA con clones individuales de bibliotecas no seleccionadas o utilizando presentación en fagos.

Para la producción recombinante de los anticuerpos de dominio único, los ácidos nucleicos que codifican los 35 anticuerpos de dominio único se aislan y se insertan en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo de dominio único se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores están 40 disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula anfitriona que se vaya a utilizar. Generalmente, las células anfitrionas preferidas son de origen procariótico o eucariótico (generalmente mamífero).

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen generalmente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) 45 o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, p. ej., hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, p. ej., éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂ o R¹N=C=NR, donde R y R¹ son 50 independientemente grupos alquilo inferior. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, diconomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la técnica sin experimentación excesiva.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, productos conjugados inmunogénicos o derivados combinando, p. ej., 55 100 µg o 5 µg de la proteína o producto conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o producto conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días después, los animales se sangran y el suero se analiza para determinar el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Los productos conjugados también se pueden preparar en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Además, los agentes agregantes tales como alumbre son adecuados para potenciar la respuesta inmunitaria.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones postraduccionales (p. ej., isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se puede preparar mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente en el presente documento para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

El agente inmunizante incluirá típicamente la proteína antigénica o una variante de fusión de la misma. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se utilizan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pág. 59-103.

Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), que son sustancias que previenen el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT.

Las células de mieloma inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan un alto nivel de producción estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, se prefieren líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, EE.UU., y células SP-2 (y derivados de las mismas, p. ej., X63-Ag8-653) disponible en la American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en donde crecen las células de hibridoma se somete a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede someter a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. Preferiblemente, la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal se pueden determinar por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede determinar mediante el análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante métodos convencionales (Goding, citado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567 y como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aisla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas

pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan a células anfitrionas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, con el fin de sintetizar anticuerpos monoclonales en tales células anfitrionas recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Pluckthun, *Immunol Revs.* 130:151-188 (1992).

Los anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas por McCafferty et al., en *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., en *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., en *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante barajado de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992) así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Típicamente, tales polipéptidos distintos de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente químérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden ser monovalentes, cuya preparación es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc para evitar el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes se pueden sustituir por otro resto de aminoácido o se suprimen para prevenir el entrecruzamiento. Los métodos in vitro también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, se puede realizar utilizando mecanismos rutinarios conocidos en la técnica.

Los anticuerpos químéricos o híbridos también se pueden preparar in vitro utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptopbutirimidato de metilo.

3. Producción recombinante en células procarióticas

a) Construcción de vectores

Las secuencias de ácido polinucleico que codifican los anticuerpos utilizados en la invención se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias de ácidos polinucleicos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en anfitriones procarióticos. Se pueden utilizar vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y de la célula anfitriona particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogos, o ambas) y su compatibilidad con la célula anfitriona particular en donde reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y de control que derivan de especies compatibles con la célula anfitriona se utilizan con relación a estos anfitriones. El vector porta ordinariamente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por tanto proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para que contengan, promotores que se pueden utilizar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322

utilizados para la expresión de anticuerpos particulares son descritos en detalle por Carter et al., en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.648.237.

Además, los vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y control que son compatibles con el microorganismo anfitrión se pueden utilizar como vectores transformantes con relación a estos anfitriones. Por ejemplo, se pueden utilizar bacteriófagos tales como GEM™-11 para la elaboración de un vector recombinante que se pueden utilizar para transformar células anfitrionas susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada aguas arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos se incluyen típicamente en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia el aumento de niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, p. ej., presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células anfitrionas potenciales. El promotor seleccionado puede estar conectado operablemente al ADN del cistrón que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector. Se pueden utilizar tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. Se pueden utilizar promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor del polipéptido diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con anfitriones procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de la galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac o el trc. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Sus secuencias de ácido nucleico han sido publicadas, permitiendo de este modo a un experto en la técnica ligarlas operablemente a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) utilizando conectores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de esta invención debe ser una que sea reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula anfitriona. Para células anfitrionas procarióticas que no reconocen ni procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp, o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. Las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión pueden ser secuencias señal STII o variantes de las mismas.

La producción de anticuerpos puede ocurrir en el citoplasma de la célula anfitriona, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. Los componentes polipeptídicos, tales como el polipéptido que codifica el dominio V_H de la primera porción de unión a antígeno fusionado opcionalmente a la segunda porción de unión a antígeno, y el polipéptido que codifica el dominio V_L de la primera porción de unión a antígeno opcionalmente fusionado a la segunda porción de unión a antígeno, se pueden expresar, plegar y ensamblar para formar anticuerpos funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas anfitrionas (p. ej., las cepas *trxB* de *E. coli*) proporcionan condiciones citoplasmáticas que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de las subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Se divulga un sistema de expresión en el que la razón cuantitativa de los componentes polipeptídicos expresados se puede modular con el fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y ensamblados adecuadamente. Tal modulación se logra al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas traduccionales para los componentes polipeptídicos. Una técnica para modular la fuerza traduccionales es divulgada por Simmons et al., en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.840.523. Utiliza variantes de la región de iniciación traduccionales (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos con un rango de fuerzas traduccionales, proporcionando de este modo un medio conveniente mediante el cual ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR pueden generarse mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan como resultado cambios de codón que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de ácido nucleico. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o el espaciado de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede conseguir cambiando la tercera posición de nucleótido de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y

arginina, tienen múltiples primera y segunda posiciones que pueden añadir complejidad al elaborar el banco. Este método de mutagénesis es descrito en detalle por Yansura et al. (1992) en *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Preferiblemente, se genera un conjunto de vectores con un rango de intensidades de TIR para cada cistrón en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos proteicos deseados en diversas combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR se pueden determinar cuantificando el nivel de expresión de un gen informador como describen en detalle Simmons et al. en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.840.523. Basándose en la comparación de la fuerza traduccional, se seleccionan las TIR individuales deseadas para combinarse en las construcciones del vector de expresión.

10 b) Células anfitrionas procarióticas.

Las células anfitrionas procarióticas adecuadas para expresar los anticuerpos incluyen Arqueobacterias y Eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (p. ej., *E. coli*), *Bacilli* (p. ej., *B. subtilis*), Enterobacterias, especies de (p. ej., *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. En algunas realizaciones, se utilizan células gram negativas. En un ejemplo se utilizan células de *E. coli* como anfitriones.

Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; Depósito ATCC Núm. 27, 325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A (nmpc-fepE) degP41kan^R (Patente de Estados Unidos Núm. 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y son descritos, por ejemplo, por Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Generalmente es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden utilizar adecuadamente especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* como anfitrón cuando se utilizan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón.

Típicamente, la célula anfitriona debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse deseablemente inhibidores de proteasa adicionales al cultivo celular.

c) Producción de proteínas

Las células anfitrionas se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Transformación significa introducir ADN en el anfitrón procariótico de manera que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o bien como un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula anfitriona utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se utiliza generalmente para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de la pared celular. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utilizada adicional es la electroporación.

Las células procarióticas utilizadas para producir los anticuerpos se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células anfitrionas seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más los suplementos nutrientes necesarios. En algunos ejemplos, los medios también contienen un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procarióticas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a ampicilina.

También se puede incluir cualquier suplemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

Las células anfitrionas procarióticas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, incluso más preferiblemente a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo anfitrón. Para *E. coli*, el pH es preferiblemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferiblemente aproximadamente 7,0.

Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión, la expresión de la proteína se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células anfitrionas transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, p. ej.,

Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se puede utilizar una variedad de otros inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

Los anticuerpos expresados se secretan y se recuperan del periplasma de las células anfítrionas. La recuperación de proteínas implica típicamente la rotura del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares o células completas se pueden eliminar por centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía con resinas de afinidad. Alternativamente, las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células se pueden eliminar del cultivo y el sobrenadante del cultivo se puede filtrar y concentrar para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar e identificar adicionalmente utilizando métodos conocidos comúnmente tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

Alternativamente, la producción de proteínas se realiza en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Para la producción de proteínas recombinantes están disponibles diversos procedimientos de fermentación discontinua a gran escala. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferiblemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

Durante el proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia típicamente después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, p. ej., una DO_{550} de aproximadamente 180-220, en cuya fase las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede utilizar una variedad de inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células se pueden cultivar durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede utilizar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los anticuerpos, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiados de los polipéptidos secretados, se pueden utilizar vectores adicionales que expresan en exceso proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para cotransformar las células procarióticas anfítrionas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados de las proteínas heterólogas producidas en células anfítrionas bacterianas. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos Núm. 6.083.715; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos Núm. 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), se pueden utilizar para la presente invención ciertas cepas anfítrionas con deficiencia de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, las cepas de células anfítrionas se pueden modificar para efectuar una o varias mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y sus combinaciones. Algunas cepas de *E. coli* con deficiencia de proteasa están disponibles y son descritas, por ejemplo, por Joly et al. (1998), más arriba; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.264.365; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos Núm. 5.508.192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

Las cepas de *E. coli* con deficiencia de enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que expresan en exceso una o más proteínas chaperonas se pueden utilizar como células anfítrionas en el sistema de expresión que codifica los anticuerpos.

d) Purificación de proteínas

Los anticuerpos producidos en el presente documento se purifican adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Se pueden emplear métodos convencionales de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ilustrativos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, la Proteína A inmovilizada sobre una fase sólida se utiliza para la purificación por inmunoafinidad de los anticuerpos que comprenden una región Fc. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 KD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad a la región Fc de anticuerpos. Lindmark et al. (1983) *J. Immunol. Met.* 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la proteína A es preferiblemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferiblemente una columna de vidrio de poro controlado o una

columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de prevenir la adherencia no específica de contaminantes. La fase sólida se lava después para eliminar contaminantes unidos no específicamente a la fase sólida. Finalmente, los anticuerpos de interés se recuperan de la fase sólida por elución.

5 **4. Producción recombinante en células eucarióticas**

Para la expresión eucariótica, los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes, una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores y elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

a) Componente de secuencia señal

10 Un vector para su uso en un anfitrión eucariótico también puede ser un inserto que codifica una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que es reconocida y procesada (es decir, es escindida por una peptidasa señal) por la célula anfitriona. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

15 El ADN para tal región precursora se liga en el marco de lectura al ADN que codifica los anticuerpos.

b) Origen de replicación

Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 se puede utilizar típicamente sólo porque contiene el promotor temprano).

c) Componente del gen de selección

20 Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, p. ej., el gen que codifica la D-alanina racemasa para Bacilli.

25 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula anfitriona. Aquellas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

30 Otros ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica los anticuerpos, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

35 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula anfitriona apropiada cuando se emplea DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con deficiencia de actividad DHFR (p. ej., ATCC CRL-9096).

40 Alternativamente, las células anfitrionas (particularmente anfitriones de tipo salvaje que contienen DHFR endógena) transformadas o co-transformadas con las secuencias de ADN que codifican polipéptidos, la proteína DHFR de tipo salvaje y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, p. ej., kanamicina, neomicina o G418. Véase la Patente de Estados Unidos Núm. 4.965.199.

d) Componente promotor

45 Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo anfitrión y está conectado operablemente al ácido nucleico que codifica las secuencias polipeptídicas deseadas. Prácticamente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido. El extremo 3' de la mayoría de los eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se pueden insertar en vectores de expresión eucarióticos.

Otros promotores adecuados para uso con anfitriones procarióticos incluyen el promotor phoA, sistemas promotores de lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp), y promotores híbridos tales como el promotor tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) conectada operablemente al ADN que codifica los anticuerpos.

5 La transcripción de polipéptidos a partir de vectores en células anfitrionas de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de poliomielitis, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente Virus de Simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, p. ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células anfitrionas.

10 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en 15 anfitriones mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.601.978. Véase también Reyes et al., *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, se puede utilizar como promotor la repetición terminal larga del virus del Sarcoma de Rous.

20 **e) Componente del elemento potenciador**

La transcripción de un ADN que codifica los anticuerpos por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando 25 una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen 30 de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliomielitis en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

35 **f) Componente de terminación de la transcripción**

Los vectores de expresión utilizados en células anfitrionas eucarióticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente 40 disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el polipéptido. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en la misma.

45 **g) Selección y transformación de células anfitrionas**

Las células anfitrionas adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de este documento incluyen células eucarióticas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células anfitrionas de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas celulares anfitrionas de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por 50 SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células ováricas de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mathr et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

55 Las células anfitrionas se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutricionales convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

h) Cultivo de las células anfítrionas

Las células anfítrionas utilizadas para producir los anticuerpos se pueden cultivar en una diversidad de medios. Los medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células anfítrionas. Además, cualquiera de los medios descritos por Ham et al., en *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., en *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), Patentes de Estados Unidos Núm. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; los documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o el documento U.S. Pat. Re. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células anfítrionas. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula anfítriona seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

i) Purificación de proteínas

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, los anticuerpos se pueden producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos particulados, ya sean células anfítrionas o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplasmático de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los restos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de proteína preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diáisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar los anticuerpos que se basan en inmunoglobulinas humanas que contienen 1, 2 o 4 cadenas pesadas (Lindmark et al., *J. Immunol. Met.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para humano (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se ancla el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina-SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico también se encuentran disponibles dependiendo del anticuerpo que se vaya a recuperar.

Después de etapas cualesquiera de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente realizado a bajas concentraciones salinas (p. ej., de aproximadamente 0 a 0,25 M de sal).

(La sección "productos inmunoconjungados" se divulga como referencia. Las realizaciones divulgadas en esta sección no son realizaciones de la invención).

Productos inmunoconjungados

En algunas realizaciones, también hay productos inmunoconjungados que comprenden cualquiera de los anticuerpos (tales como anticuerpos de dominio único) descritos en el presente documento conjungados con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos.

En algunas realizaciones, un producto inmunoconjugado es un producto conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitación, un maitansinoide (véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristatina

5 tal como los radicales de fármaco de monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o uno de sus derivados (véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998); una antraciclina tal como daunomicina o doxorrubicina (véase Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y Patente de Estados Unidos Núm. 6.630.579); metotrexato; videsina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, lartotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En algunas realizaciones, un producto inmunoconjugado comprende un anticuerpo tal como se describe en la presente memoria conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, la cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

20 En algunas realizaciones, un producto inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un producto radioconjugado. Para la producción de productos radioconjugados están disponibles una variedad de isótopos radiactivos. Los ejemplos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{125}Y , ^{90}Re , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el producto radioconjugado se utiliza para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, ^{99m}Tc o ^{123}I , o un marcador de espín para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

30 Los productos conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico se pueden preparar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehido), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, 35 se puede preparar una inmunotoxina de ricina como describen Vitetta et al., en *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildiethil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un conector lábil a ácidos, conector sensible a peptidasas, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector 40 que contiene disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos Núm. 5.208.020).

45 Los productos inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, productos conjugados preparados con reactivos de entrecruzamiento que incluyen, pero no se limitan a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (p. ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.).

Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

La sección "métodos y composiciones para diagnóstico y detección" se divulga como referencia. Las realizaciones divulgadas en esta sección no son realizaciones de la invención.

50 En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos (tales como anticuerpos de dominio único) proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia del antígeno correspondiente (tal como CD19, CD20, BCMA o CD38) en una muestra biológica. El término "detectar", como se emplea en el presente documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica es sangre, suero u otras muestras líquidas de origen biológico. En algunas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD19 (tal como uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-CD19 descritos en el presente documento) para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de CD19 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende detectar la presencia de proteína CD19 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, CD19 es CD19 humano. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD19 como se describe en el presente documento en condiciones permisivas

para la unión del anticuerpo anti-CD19 a CD19, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD19 y CD19. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo anti-CD19 para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-CD19, p. ej., cuando CD19 es un biomarcador para la selección de pacientes.

- 5 En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD20 (tal como uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-CD20 descritos en el presente documento) para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de CD20 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende detectar la presencia de proteína CD20 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, CD20 es CD20 humano. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD20 como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD20 a CD20, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD20 y CD20. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo anti-CD20 para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-CD20, p. ej., cuando CD20 es un biomarcador para la selección de pacientes.
- 10 15 En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-BCMA (tal como uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-BCMA descritos en el presente documento) para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de BCMA en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende detectar la presencia de proteína BCMA en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, BCMA es BCMA humano. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-BCMA como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-BCMA a BCMA, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-BCMA y BCMA. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo anti-BCMA para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-BCMA, p. ej., cuando BCMA es un biomarcador para la selección de pacientes.
- 20 25 En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD38 (tal como uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-CD38 descritos en el presente documento) para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de CD38 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende detectar la presencia de proteína CD38 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, CD38 es CD38 humano. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD38 como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-CD38 a CD38, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD38 y CD38. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo anti-CD38 para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo, cuando CD38 es un biomarcador para la selección de pacientes.
- 30 35 En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos marcados (tales como anticuerpos de dominio único anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38). Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrón-densos, quimioluminiscentes y radiactivos), así como radicales, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p. ej., a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^{3}H , y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelíferona, luciferinas, p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de Estados Unidos Núm. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, p-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, p. ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasa heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.
- 40 45

III. Receptores de antígeno químéricos

- 50 La presente invención proporciona un CAR como se define en las reivindicaciones. Un receptor de antígeno químérico (CAR) puede comprender un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende uno o más anticuerpos de dominio único (tal como V_HH). Se puede utilizar uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único descritos en la Sección II en los CAR descritos en el presente documento. Los CAR ilustrativos que comprenden uno o más dominios V_HH (es decir, CAR basados en V_HH) se ilustran y se comparan con los CAR convencionales que comprenden scFv (es decir, CAR basados en scFv) en las FIG. 1A-1D. Un experto en la técnica reconocería que los dominios V_HH en los CAR ilustrativos de las FIG. 1A-1D puedes ser sustituidos por otros sdAb.

60 Un receptor de antígeno químérico (CAR) que comprende un polipéptido puede comprender: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a un antígeno (tal como un antígeno tumoral); (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. El antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. El sdAb puede ser

de camélido, químérico, humano o humanizado. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD28, un dominio de señalización coestimulador de CD28 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador de CD137 y dominio de señalización intracelular de CD3ζ. El CAR de la invención se puede describir como monoespecífico. El CAR de la invención se puede describir como multivalente, tal como bivalente o trivalente.

Receptores de antígeno químéricos de dianas específicas

Los CAR pueden comprender un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38 descritos en el presente documento. Los CAR pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (tal como biespecíficos o de mayor número de especificidades), y los CAR pueden ser monovalentes o multivalentes (tal como bivalentes, trivalentes o de mayor número de valencias). En la Tabla 4 se muestra como referencia una lista de receptores de antígeno químéricos monoespecíficos ilustrativos, secuencias ilustrativas, construcciones y vectores de los mismos.

Las Tablas 4, 5 y 6 enumeradas en la sección "III. Receptor de antígeno químérico" utilizan las siguientes abreviaturas: Ej.: ilustrativo; Vec.: vector; AA: secuencia de aminoácidos de CAR; AN: secuencia de ácido nucleico de CAR; PS: péptido señal; Extracelular: dominio de unión a antígeno extracelular; sdAb: anticuerpo de dominio único; TM: dominio transmembrana; CO1: dominio de señalización coestimulador 1; CO2: dominio de señalización coestimulador 2; Prim.: dominio de señalización intracelular primario. Los dominios se enumeran de izquierda a derecha de cada fila que corresponde al orden de los dominios del extremo N-terminal al extremo C-terminal del polipéptido de CAR.

CAR de BCMA

Un CAR que se dirige a BCMA (también denominado en el presente documento "CAR de BCMA") puede comprender un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA es de camélido, químérico, humano o humanizado. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD28, un primer dominio de señalización coestimulador de CD28, un segundo dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ. El CAR de BCMA se puede describir como monoespecífico.

Un CAR de BCMA puede comprender un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el sdAb anti-BCMA comprende uno cualquiera de los siguientes:

- 5 una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; o
- 10 una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.
- 15 10 El sdAb anti-BCMA puede ser de camélido, quimérico, humano o humanizado. El sdAb anti-BCMA puede comprender un dominio V_H que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 80 y 87. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8 α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8 α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD28, un primer dominio de señalización coestimulador de CD28, un segundo dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD8 α , un dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3 ζ . El CAR de BCMA se puede describir como monoespecífico.
- 20 25
- 30 Como referencia se divulga un CAR de BCMA que comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 152-162 y 257-259. Como referencia, se divulga un CAR de BCMA que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 152-162 y 257-259. También se divulga como referencia un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 152-162 y 257-259.
- 35 40
- 45 Como referencia, se divulga un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los CAR de BCMA divulgados en el presente documento. Como referencia, se divulga un ácido nucleico aislado que tiene al menos aproximadamente una cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 175-185 y 261-263. Como referencia, se divulga un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 175-185 y 261-263. El ácido nucleico aislado puede ser un ADN. El ácido nucleico aislado puede ser un ARN. Un vector puede comprender uno cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican los CAR de BCMA descritos anteriormente. El vector puede ser un vector de expresión. El vector puede ser un vector viral, tal como un vector lentiviral.

Tabla 4. CAR monovalentes monoestimuladores ilustrativos. (divulgados como referencia)

Ej. Nombre de Vector o CAR	SEQ ID AA ilustr.	SEQ ID AN ilustr.	PS	sdAb extracelular	Bisagra	TM	Señalización intracelular		
							CO1	CO2	Prim.
CAR de BCMA									
PLVX-hEF1a-269A37346	152	175	CD8 α	269A37346	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ
PLVX-hEF1a-269A37348	153	176	CD8 α	269A37348	CD8 α	CD28	CD28	CD137	CD3 ζ

ES 2 984 851 T3

Ej. Nombre de Vector o CAR	SEQ ID AA ilustr.	SEQ ID AN ilustr.	PS	sdAb extracelular	Bisagra	TM	Señalización intracelular		
							CO1	CO2	Prim.
CAR de BCMA									
PLVX-hEF1a-269A37917	154	177	CD8α	269A37917	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37355	155	178	CD8α	269A37355	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37915	156	179	CD8α	269A37915	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37936	157	180	CD8α	269A37936	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37953	158	181	CD8α	269A37953	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37965	159	182	CD8α	269A37965	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37972	160	183	CD8α	269A37972	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37353	161	184	CD8α	269A37353	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-269A37948	162	185	CD8α	269A37948	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
CAR GSI5011	257	261	CD8α	269A37346	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ
CAR GSI5019	258	262	CD8α	269A37353	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ
CAR GSI5020	259	263	CD8α	269A37917	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ
CAR de CD38									
PLVX-hEF1a-38A37333	163	186	CD8α	38A37333	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37336	164	187	CD8α	38A37336	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37699	165	188	CD8α	38A37699	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37331	166	189	CD8α	38A373 31	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37717	167	190	CD8α	38A37717	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ

PLVX-hEF1a-38A37719	168	191	CD8α	38A37719	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37330	169	192	CD8α	38A37330	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37334	170	193	CD8α	38A37334	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37730	171	194	CD8α	38A37730	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37340	172	195	CD8α	38A37340	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37731	173	196	CD8α	38A37731	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
PLVX-hEF1a-38A37326	174	197	CD8α	38A37326	CD8α	CD28	CD28	CD137	CD3ζ
CAR V _H H CD19	248	250	CD8α	V _H H CD19	CD8α	CD28	CD28	NA	CD3ζ
CAR V _H H CD20	249	251	CD8α	V _H H CD20	CD8α	CD28	CD28	NA	CD3ζ
CAR GS15012	260	264	CD8α	38A37717	CD8α	CD8α	CD137	NA	CD3ζ

Receptores de antígeno químéricos multivalentes

La presente invención proporciona CAR anti-BCMA multivalentes como se define en las reivindicaciones. Los sitios de unión específicos para el mismo antígeno se pueden unir al mismo epítopo del antígeno o unirse a diferentes epítopos del antígeno.

- 5 Un receptor de antígeno químérico multivalente (tal como bivalente, trivalente o de mayor número de valencias) puede comprender un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende una pluralidad (tal como aproximadamente uno cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) de anticuerpos de dominio único (sdAb) que se unen específicamente a un antígeno (tal como un antígeno tumoral); (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. El antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. La pluralidad de sdAb puede ser de camélido, químérico, humano o humanizado. La pluralidad de anticuerpos de dominio único puede fusionarse entre sí a través de enlaces peptídicos o conectores peptídicos. Cada conector peptídico puede tener no más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. El dominio transmembrana se puede seleccionar del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). El dominio de señalización intracelular primario puede derivar de CD3ζ. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador puede derivar de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. El polipéptido puede comprender del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. El CAR multivalente puede ser monoespecífico. El CAR multivalente puede ser multiespecífico, tal como biespecífico.
- 10 Un receptor de antígeno químérico multivalente (tal como bivalente, trivalente o de mayor número de valencias) puede comprender un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer
- 15
- 20
- 25
- 30

anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un primer epítopo de un antígeno (tal como un antígeno tumoral) y un segundo anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un segundo epítopo del antígeno; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer epítopo y el segundo epítopo son diferentes. El antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38,

5 BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. El primer sdAb y/o el segundo sdAb pueden ser de camélido, químicos, humanos o humanizados. El primer anticuerpo de dominio único y el segundo anticuerpo de dominio único pueden fusionarse entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. El conector peptídico puede tener no más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. El dominio transmembrana se puede seleccionar del grupo que consiste en CD8a, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). El dominio de señalización intracelular primario puede derivar de CD3ζ. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador puede derivar de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que

10 consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. El polipéptido puede 20 comprender del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. El CAR multivalente puede ser monoespecífico. El CAR multivalente puede ser multiespecífico, tal como biespecífico.

25 Los CAR multivalentes descritos en el presente documento pueden ser especialmente adecuados para dirigirse a antígenos multiméricos mediante unión sinérgica por los diferentes sitios de unión a antígeno, o para potenciar la afinidad de unión o avidez por el antígeno. Cualquier de los anticuerpos de dominio único descritos en el presente documento, tales como los anticuerpos anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38, se puede utilizar en el dominio de unión a antígeno extracelular de los CAR multivalentes descritos en el presente documento. En la Tabla 5 se muestra una lista de receptores de antígeno químicos multivalentes monoespecíficos ilustrativos, secuencias 30 ilustrativas, construcciones y vectores de los mismos.

1. CAR de BCMA multivalente

Un CAR multivalente que se dirige a BCMA (también denominado en el presente documento "CAR de BCMA multivalente") puede comprender (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende una pluralidad (tal como 2, 3 o más) de un sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular.

35 El sdAb anti-BCMA puede ser de camélido, químico, humano o humanizado. La pluralidad del sdAb anti-BCMA puede fusionarse entre sí a través de enlaces peptídicos o conectores peptídicos. El conector peptídico puede tener no más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. El dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). El dominio de señalización intracelular 40 primario puede derivar de CD3ζ. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador puede derivar de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. El CAR de BCMA multivalente puede comprender adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. El CAR de BCMA multivalente puede 45 comprender adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. El polipéptido puede comprender del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado 50 de CD3ζ. El CAR de BCMA multivalente puede ser bivalente, el CAR de BCMA multivalente puede ser trivalente. Cualquier de los sdAb anti-BCMA se puede utilizar para construir el CAR de BCMA multivalente.

Un CAR de BCMA multivalente puede comprender: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer sdAb anti-BCMA y un segundo sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer sdAb anti-BCMA y el segundo sdAb anti-BCMA se unen específicamente 55 a diferentes epítopos en BCMA. El primer sdAb anti-BCMA se puede localizar en el extremo N-terminal del segundo sdAb anti-BCMA. El primer sdAb anti-BCMA se puede localizar en el extremo C-terminal del segundo sdAb anti-BCMA. El primer sdAb anti-BCMA y el segundo sdAb anti-BCMA pueden fusionarse entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. El conector peptídico puede tener no más de aproximadamente 50 (tal como no más de 60 aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). El dominio de señalización intracelular primario puede derivar de CD3ζ. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador

puede derivar de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40,

CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. El CAR de BCMA multivalente puede comprender adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8 α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. El CAR de BCMA multivalente puede comprender adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8 α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. El polipéptido puede comprender del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD8 α , un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3 ζ . El CAR de BCMA multivalente puede ser bivalente, el CAR de BCMA multivalente puede ser trivalente. El dominio de unión a antígeno extracelular puede comprender adicionalmente un tercer sdAb anti-BCMA que se une específicamente a un epitopo que es diferente del primer y el segundo sdAb anti-BCMA. Cualquiera de los sdAb anti-BCMA se puede utilizar para construir el CAR de BCMA multivalente.

La presente invención proporciona un CAR de BCMA multivalente que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer sdAb anti-BCMA y un segundo sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer sdAb anti-BCMA comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y en donde el segundo sdAb anti-BCMA comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el primer sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87. En algunas realizaciones, el primer sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80. En algunas realizaciones, el primer sdAb anti-BCMA está localizado en el extremo N-terminal del segundo sdAb anti-BCMA. En algunas realizaciones, el primer sdAb anti-BCMA está localizado en el extremo C-terminal del segundo sdAb anti-BCMA. En algunas realizaciones, el primer sdAb anti-BCMA y el segundo sdAb anti-BCMA se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA multivalente comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8 α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA multivalente comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8 α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD8 α , un dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3 ζ . El CAR de BCMA multivalente se puede describir como bivalente.

En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de BCMA multivalente que comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 265-270. En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de BCMA multivalente que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 265-270. También se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 265-270.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los CAR multivalentes de BCMA de la invención. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 271-276. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 271-276. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un ADN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un ARN. En algunas realizaciones, se proporciona un vector que comprende uno cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican los CAR de BCMA multivalentes de la invención. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, tal como un vector lentiviral.

Tabla 5. CAR multivalente, monoespecífico ilustrativo.

CAR	SEQ ID AA ilustr.	SEQ ID AN ilustr.	PS	Dominio de unión al antígeno extracelular					Bisagra	TM	Señalización intracelular	
				sdAb Núm.1	SEQ ID Núm.1 Conector	sdAb Núm.2	SEQ ID Núm.2 Conector	sdAb Núm.3			CO 1	Prim.
GSI5 014	198	202	CD 8 α	269A 37346	144	269A 37346	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 015	199	203	CD 8 α	269A 37346	144	269A 37346	144	269A 37346	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 016	200	204	CD 8 α	38A3 7717	144	38A3 7717	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 017	201	205	CD 8 α	38A3 7717	144	38A3 7717	144	38A3 7717	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 021	265	271	CD 8 α	269A 37353	144	269A 37917	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 022	266	272	CD 8 α	269A 37353	149	269A 37917	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 023	267	273	CD 8 α	269A 37353	151	269A 37917	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 024	268	274	CD 8 α	269A 37917	145	269A 37353	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 025	269	275	CD 8 α	269A 37917	149	269A 37353	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ
GSI5 026	270	276	CD 8 α	269A 37917	150	269A 37353	AN	AN	CD8 α	CD 8 α	CD 137	CD3 ζ

(* = CAR multivalentes de BCMA de la invención. Otros CAR se divulan como referencia).

Receptor de antígeno químérico multiespecífico (La sección "receptor de antígeno químérico multiespecífico" se divulga como referencia. Las realizaciones divulgadas en esta sección no son realizaciones de la invención).

- 5 La presente divulgación proporciona adicionalmente receptores de antígeno químéricos multiespecíficos que se dirigen a dos o más (tal como aproximadamente uno cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más) antígenos diferentes. En algunas realizaciones, el CAR multiespecífico tiene un sitio de unión a antígeno para cada antígeno. En algunas realizaciones, el CAR multiespecífico tiene más de dos sitios de unión para al menos un antígeno. Cada sitio de unión a antígeno 10 puede comprender un anticuerpo de dominio único. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el receptor de antígeno químérico multiespecífico es un CAR biespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende dos sdAb diferentes, uniéndose cada uno específicamente a un antígeno. En algunas realizaciones, el CAR multiespecífico es un CAR triespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende tres sdAb diferentes, uniéndose cada uno específicamente a un antígeno.
- 15 En algunas realizaciones, se proporciona un receptor de antígeno químérico (CAR) multiespecífico (tal como biespecífico) que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a un primer antígeno (tal como un primer antígeno tumoral) y un segundo anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a un segundo antígeno (tal como un segundo antígeno tumoral); (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer antígeno es diferente del segundo antígeno. En algunas realizaciones, el primer antígeno y/o el segundo antígeno se seleccionan del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, 20

BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. En algunas realizaciones, el primer sdAb y/o el segundo sdAb son de camélido, químéricos, humanos o humanizados.

En algunas realizaciones, el primer anticuerpo de dominio único y el segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR multiespecífico comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR multiespecífico comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipeptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD28, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD28 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ.

Dependiendo del antígeno deseado que se vaya a elegir como diana, los CAR se pueden modificar mediante ingeniería genética para incluir los anticuerpos de dominio único apropiados que son específicos para los antígenos deseados. Uno cualquiera o más de los anticuerpos anti-CD19, anti-CD20, anti-BCMA o anti-CD38 descritos en el presente documento se pueden utilizar en el dominio de unión a antígeno extracelular en los CAR de la presente divulgación. Los anticuerpos de dominio único se pueden disponer en cualquier orden adecuado. Por ejemplo, el primer anticuerpo de dominio único se fusiona en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del segundo anticuerpo de dominio único. Un conector peptídico adecuado se puede colocar entre diferentes anticuerpos de dominio único para evitar impedimento estérico entre los anticuerpos de dominio único. En la Tabla 6 se muestra como referencia una lista de receptores de antígeno químicos biespecíficos ilustrativos, secuencias ilustrativas, construcciones y vectores de los mismos.

1. CAR de BCMA x CD38

En algunas realizaciones, el CAR es un CAR biespecífico que se dirige simultáneamente a BCMA y CD38. Por ejemplo, BCMA y CD38 se pueden utilizar como candidatos para elegir como diana antígenos expresados en células de mieloma múltiple.

En algunas realizaciones, se proporciona un receptor de antígeno químico multiespecífico (tal como biespecífico) que se dirige a BCMA y CD38 (también denominado en el presente documento CAR de "BCMA x CD38") que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a BCMA y un segundo anticuerpo de dominio único que se une específicamente a CD38; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el primer sdAb y/o el segundo sdAb son de camélido, químéricos, humanos o humanizados. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo de dominio único y el segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el primer sdAb se fusiona en el extremo N-terminal del segundo sdAb. En algunas realizaciones, el primer sdAb se fusiona en el extremo C-terminal del segundo sdAb. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 144-151. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA x CD38 comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA x CD38 comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137

y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3 ζ .

En algunas realizaciones, se proporciona un receptor de antígeno quimérico multiespecífico (tal como biespecífico) que se dirige a BCMA y CD38 (también denominado en el presente documento "CAR de BCMA x CD38") que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un anticuerpo de dominio único anti-BCMA y un anticuerpo de dominio único anti-CD38; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; y en donde el anticuerpo anti-CD38 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68. En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA y/o el sdAb anti-CD38 son de camélido, quiméricos, humanos o humanizados. En algunas realizaciones, los sdAb anti-BCMA comprenden un dominio V_HH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En algunas realizaciones, los sdAb anti-CD38 comprenden un dominio V_HH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93. En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA y el sdAb anti-CD38 se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA se fusiona en el extremo N-terminal del sdAb anti-CD38. En algunas realizaciones, el primer anti-BCMA se fusiona en el extremo C-terminal del sdAb anti-CD38. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 144-151. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8 α , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA x CD38 comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8 α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA x CD38 comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8 α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido.

En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de BCMA x CD38 que comprende un polipéptido que comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , un anticuerpo de dominio único anti-CD38, un conector peptídico, un anticuerpo de dominio único anti-BCMA, un dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD8 α , un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3 ζ ; en donde el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; y en donde el anticuerpo anti-CD38 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 144-151. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA x CD38 comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 207-211. En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de BCMA x CD38 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 207-211. También se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 207-211.

En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de BCMA x CD38 que comprende un polipéptido que comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , un anticuerpo de dominio único anti-BCMA, un conector peptídico, un anticuerpo de dominio único anti-CD38, un dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD8 α , un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3 ζ ; en donde el anticuerpo de dominio único anti-BCMA comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; y en donde el anticuerpo anti-CD38 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada

del grupo que consiste en SEQ ID NO: 144-151. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA x CD38 comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 212-216. En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de BCMA x CD38 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:

5 212-216. También se proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 212-216.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los CAR de BCMA x CD38 proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 218-227. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 218-227. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un ADN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un ARN. En

10 15 algunas realizaciones, se proporciona un vector que comprende uno cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican los CAR de BCMA x CD38 descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, tal como un vector lentiviral.

2. CAR de CD19 x CD20

20 En algunas realizaciones, los antígenos de diferenciación de células B tales como CD19 y CD20 son candidatos para antígenos diana en linfoma de células B. Algunos de estos antígenos se han utilizado como dianas para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado. En algunas realizaciones, el CAR es un CAR biespecífico que se dirige simultáneamente a CD19 y CD20.

25 En algunas realizaciones, se proporciona un receptor de antígeno químérico multiespecífico (tal como biespecífico) que se dirige a CD19 y CD20 (también denominado en el presente documento "CAR de CD19 x CD20") que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer

30 anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a CD19 y un segundo anticuerpo de dominio único que se une específicamente a CD20; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el primer sdAb y/o el segundo sdAb son de camélido, químéricos, humanos o humanizados. En

35 algunas realizaciones, el primer anticuerpo de dominio único y el segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el primer sdAb se fusiona en el extremo N-terminal del segundo sdAb. En algunas realizaciones, el primer sdAb se fusiona en el extremo C-terminal del segundo sdAb. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas

40 realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 144-151. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunas

45 realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x CD20 comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del

50 dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x CD20 comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD28, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD28 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un receptor de antígeno químérico multiespecífico (tal como biespecífico) que se dirige a CD19 y CD20 (también denominado en el presente documento "CAR de CD19 x CD20") que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un anticuerpo de dominio único anti-CD19 y un anticuerpo de dominio único anti-CD20; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el anticuerpo de dominio único anti-CD19 comprende una

60 CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y en donde el anticuerpo anti-CD20 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 y/o el sdAb anti-CD20 es son de camélido, químéricos, humanos o humanizados. En algunas realizaciones, los sdAb anti-CD19 comprenden un

65 dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, los sdAb anti-CD20 comprenden un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77. En algunas

realizaciones, el sdAb anti-CD19 y el sdAb anti-CD20 se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 se fusiona en el extremo N-terminal del sdAb anti-CD20. En algunas realizaciones, el primer anti-CD19 se fusiona en el extremo C-terminal del sdAb anti-CD20. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x CD20 comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x CD20 comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido.

En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de CD19 x CD20 que comprende un polipéptido que comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, un anticuerpo de dominio único anti-CD19, un conector peptídico, un anticuerpo de dominio único anti-CD20, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD28, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD28 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ; en donde el anticuerpo de dominio único anti-CD19 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y en donde el anticuerpo anti-CD20 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x CD20 comprende un polipéptido que tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206. En algunas realizaciones, se proporciona un CAR de CD19 x CD20 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206. También se proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 206.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los CAR de CD19 x CD20 proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 217. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 217. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un ADN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado es un ARN. En algunas realizaciones, se proporciona un vector que comprende uno cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican los CAR de CD19 x CD20 descritos anteriormente. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, tal como un vector lentiviral.

Actualmente, las inmunoterapias dirigidas a CD19 han observado resultados notables en ensayos clínicos. Los ensayos clínicos basados en células CAR T de CD19 del tratamiento de LLA a corto plazo pueden lograr aproximadamente 90% de eficacia de remisión completa. Sin embargo, se encontró que aproximadamente 10% de los pacientes recaían después de unos pocos meses de tratamiento. La razón principal fue que se perdió CD19 durante la maduración de las células B a células plasmáticas y las células tumorales residuales produjeron las variantes de escape por pérdida de antígeno CD19. Los CAR de CD19 x CD20 descritos en el presente documento se pueden dirigir simultáneamente a antígenos de superficie tumoral CD19 y CD20, que pueden potenciar la actividad antitumoral sistémica de linfocitos T, y reducir los fenómenos de escape de la diana que provocaron al menos el 30% de la recaída de leucemia después de la terapia con CAR.

3. Otros CAR multiespecíficos ilustrativos

En algunas realizaciones, se proporciona un receptor de antígeno químérico multiespecífico (tal como biespecífico) que se dirige a CD19 y CD22 (también denominado en el presente documento "CAR de CD19 x CD22") que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un anticuerpo de dominio único anti-CD19 y un anticuerpo de dominio único anti-CD22; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 y/o el sdAb anti-CD22 son de camélido, químéricos, humanos o humanizados. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-CD22 y el anticuerpo de dominio único anti-CD22 se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 se fusiona en el extremo N-terminal del sdAb anti-CD22. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 se fusiona en el extremo C-terminal del sdAb anti-CD22. En algunas

realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 144-151. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8a, CD4, CD28, CD137, CD80, 5 CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, 10 CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x CD22 comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8a) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x CD22 comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8a) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un 15 péptido señal CD8a, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8a, un dominio transmembrana de CD8a, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8a, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8a, 20 un dominio transmembrana de CD28, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD28 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-CD19 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

25 En algunas realizaciones, se proporciona un receptor de antígeno químérico multiespecífico (tal como biespecífico) que se dirige a CD19 y BCMA (también denominado en el presente documento "CAR de CD19 x BCMA") que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un anticuerpo de dominio único anti-CD19 y un anticuerpo de dominio único anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 y/o el sdAb anti-BCMA son de camélido, químéricos, humanos o humanizados. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-BCMA y el anticuerpo de dominio único anti-BCMA se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 se fusiona en el extremo N-terminal del sdAb anti-BCMA. En algunas realizaciones, el sdAb anti-CD19 se fusiona en el extremo C-terminal del sdAb anti-BCMA. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 144-151. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8a, CD4, CD28, CD137, CD80, 30 CD86, CD152 y PD1. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, 35 CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x BCMA comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8a) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de CD19 x BCMA comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8a) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un 40 péptido señal CD8a, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8a, un dominio transmembrana de CD8a, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8a, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8a, 45 un dominio transmembrana de CD28, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD28 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-CD19 comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Tabla 6. CAR biespecíficos ilustrativos (divulgados como referencia)

CAR	SEQ ID AA ilustr.	SEQ ID AN ilustr.	PS	Dominio de unión al antígeno extracelular			Bisagra	TM	CO1	Intra.
				sdAb Núm. 1	SEQ ID Conector	sdAb Núm. 2				
CD19 x CD20	206	217	CD8α	CD19 V _H H	146	CD20 V _H H	CD8α	CD28	CD28	CD3ζ
GSI5001	207	218	CD8α	38A37 717	144	269A3 7346	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5002	208	219	CD8α	38A37 717	145	269A3 7346	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5003	209	220	CD8α	38A37 717	146	269A3 7346	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5004	210	221	CD8α	38A37 717	147	269A3 7346	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5005	211	222	CD8α	38A37 717	148	269A3 7346	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5006	212	223	CD8α	269A3 7346	144	38A37 717	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5007	213	224	CD8α	269A3 7346	145	38A37 717	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5008	214	225	CD8α	269A3 7346	146	38A37 717	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5009	215	226	CD8α	269A3 7346	147	38A37 717	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ
GSI5010	216	227	CD8α	269A3 7346	148	38A37 717	CD8α	CD8α	CD137	CD3ζ

Dominio de unión a antígeno extracelular

El dominio de unión a antígeno extracelular de los CAR de la invención comprende un primer y un segundo sdAb anti-BCMA como se define en las reivindicaciones.

Los anticuerpos de dominio único pueden fusionarse entre sí directamente a través de enlaces peptídicos, o a través de conectores peptídicos.

1. Anticuerpos de dominio único

Los CAR de la presente invención comprenden un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer y un segundo sdAb, cada uno de los cuales es un VHH. Los sdAb pueden ser de igual o de diferente origen, y de igual o diferente tamaño. Los sdAb ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, dominios variables de cadena pesada de anticuerpos solo de cadena pesada (p. ej., V_HH o V_{NAR}), moléculas de unión desprovistas naturalmente de cadenas ligeras, dominios únicos (tales como V_H o V_L) derivados de anticuerpos convencionales de 4 cadenas, anticuerpos humanizados solamente de cadena pesada, anticuerpos humanos de dominio único producidos por ratones o ratas transgénicas que expresan segmentos de cadena pesada humana, y dominios modificados mediante ingeniería genética y amazones de dominio único distintos de los derivados de anticuerpos. Cualquier sdAb conocido en la técnica o desarrollado por los autores de la presente invención, incluyendo los anticuerpos de dominio único descritos

en la Sección II de la presente solicitud, se puede utilizar para construir los CAR descritos en el presente documento. Los sdAb pueden derivar de cualquier especie incluyendo, pero sin limitación, ratón, rata, ser humano, camello, llama, lamprea, pez, tiburón, cabra, conejo y bóvido. Los anticuerpos de dominio único contemplados en el presente documento también incluyen moléculas de anticuerpo de dominio único de origen natural de especies distintas de *Camelidae* y tiburones.

En algunas realizaciones, el sdAb deriva de una molécula de unión a antígeno de dominio único de origen natural conocida como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras (también denominado en el presente documento "anticuerpos solo de cadena pesada"). Tales moléculas de dominio único son divulgadas en el documento WO 94/04678 y por Hamers-Caterman, C. et al. (1993) en *Nature* 363:446-448 por ejemplo. Por razones de claridad, el dominio variable derivado de una molécula de cadena pesada desprovista naturalmente de cadena ligera se conoce en el presente documento como $V_{H}H$ para distinguirlo del V_H convencional de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Tal molécula de $V_{H}H$ puede derivar de anticuerpos producidos en especies de *Camelidae*, por ejemplo, camello, llama, vicuña, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de *Camelidae* pueden producir moléculas de cadena pesada desprovistas naturalmente de cadena ligera, y tales $V_{H}H$ están dentro del alcance de la presente invención.

Las moléculas de $V_{H}H$ de Camélidos son aproximadamente 10 veces más pequeñas que las moléculas de IgG. Son polipéptidos sencillos y pueden ser muy estables, resistiendo condiciones extremas de pH y temperatura. Además, pueden ser resistentes a la acción de proteasas, lo que no es el caso para los anticuerpos convencionales de 4 cadenas. Además, la expresión *in vitro* de los $V_{H}H$ produce, $V_{H}H$ funcionales plegados adecuadamente, de alto rendimiento. Además, los anticuerpos generados en Camélidos pueden reconocer epítopos distintos de los reconocidos por los anticuerpos generados *in vitro* mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos o mediante inmunización de mamíferos distintos de camélidos (véase, por ejemplo, el documento WO9749805). Como tales, los CAR multiespecíficos o multivalentes que comprenden uno o más dominios $V_{H}H$ pueden interaccionar más eficazmente con dianas que los CAR multiespecíficos o multivalentes que comprenden fragmentos de unión a antígeno derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales. Puesto que se sabe que los $V_{H}H$ se unen a epítopos "inusuales" tales como cavidades o surcos, la afinidad de los CAR que comprenden tales $V_{H}H$ puede ser más adecuada para el tratamiento terapéutico que los polipéptidos multiespecíficos convencionales.

En algunas realizaciones, el sdAb deriva de una región variable de la inmunoglobulina encontrada en peces cartilaginosos. Por ejemplo, el sdAb puede derivar del isótipo de inmunoglobulina conocido como Receptor de Antígeno Novedoso (NAR) encontrado en el suero de tiburón. Los métodos para producir moléculas de dominio único derivadas de una región variable de NAR ("IgNAR") son descritos en el documento WO 03/014161 y por Streltsov (2005) en *Protein Sci.* 14:2901-2909.

En algunas realizaciones, el sdAb es recombinante, injertado con CDR, humanizado, camelizado, desinmunizado y/o generado *in vitro* (p. ej., seleccionado mediante presentación en fagos). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de las regiones marco puede alterarse por "camelización" de restos de aminoácidos específicos en las regiones marco. Camelización se refiere al remplazo o sustitución de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H (de origen natural) de un anticuerpo convencional de 4 cadenas por uno o más de los restos de aminoácidos que aparecen en la posición o posiciones correspondiente en un dominio $V_{H}H$ de un anticuerpo de cadena pesada. Esto se puede realizar de una manera conocida per se, que será clara para el experto, por ejemplo, basándose en la descripción adicional en el presente documento. Tales sustituciones de "camelización" se insertan preferiblemente en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfase $V_{H}\text{-}V_L$, y/o en los restos llamados distintivos de *Camelidae*, como se define en la presente memoria (véanse por ejemplo el documento WO 94/04678, Davies y Riechmann FEBS Letters 339: 285-290, 1994; Davies y Riechmann Protein Engineering 9 (6): 531-537, 1996; Riechmann J. Mol. Biol. 259: 957-969, 1996; y Riechmann y Muyldermans J. Immunol. Met. 231: 25-38, 1999).

El sdAb puede ser un anticuerpo humano de dominio único producido por ratones transgénicos o ratas que expresan segmentos de cadena pesada humana. Véanse, p. ej., el documento US20090307787A1, la Patente de Estados Unidos Núm. 8.754.287, el documento US20150289489A1, el documento US20100122358A1 y el documento WO2004049794. El sdAb puede experimentar maduración de la afinidad.

Los dominios $V_{H}H$ de origen natural contra un antígeno o diana particulares, se pueden obtener a partir de bibliotecas (no sensibilizadas previamente o inmunitarias) de secuencias de $V_{H}H$ de Camélido. Tales métodos pueden implicar o no el escrutinio de tal biblioteca utilizando dicho antígeno o diana, o al menos una parte, fragmento, determinante antígenico o epítopo de los mismos utilizando una o más técnicas de escrutinio conocidas per se. Tales bibliotecas y técnicas se describen, por ejemplo, en los documentos WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 y WO 03/035694. Alternativamente, se pueden utilizar bibliotecas sintéticas o semisintéticas mejoradas derivadas de bibliotecas de $V_{H}H$ (no sensibilizadas previamente o inmunitarias), tales como bibliotecas de $V_{H}H$ obtenidas a partir de bibliotecas de $V_{H}H$ (no sensibilizadas previamente o inmunitarias) mediante técnicas tales como mutagénesis aleatoria y/o barajado de CDR, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/43507.

Los anticuerpos de dominio único se pueden generar a partir de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 368 684, Ward et al. (Nature 12 de octubre de 1989; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; el documento WO 06/030220; y el documento WO 06/003388.

2. Antígenos

El antígeno diana de los CAR de la presente invención es BCMA. Se divultan otros antígenos como referencia. Los anticuerpos de dominio único se pueden elegir para reconocer un antígeno que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado de enfermedad especial. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral está asociado con una neoplasia maligna de células B. Los tumores expresan un número de proteínas que pueden servir como antígeno diana para una respuesta inmunitaria, particularmente respuestas inmunitarias mediadas por células T. Los antígenos elegidos como diana por el CAR pueden ser antígenos en una única célula enferma o antígenos que se expresan en diferentes células que contribuyen cada una a la enfermedad. Los antígenos elegidos como diana por el CAR pueden estar implicados directa o indirectamente en las enfermedades.

5 Los antígenos tumorales son proteínas que son producidas por células tumorales que pueden provocar una respuesta inmunitaria, particularmente respuestas inmunitarias mediadas por células T. La selección del antígeno diana dependerá del tipo particular de cáncer que se vaya a tratar. Los antígenos tumorales ilustrativos incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembionario (CEA), gonadotropina coriónica humana β , alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva con lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CAIX, telomerasa transcriptasa inversa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, Prostein, PSMA, HER2/neu, survivina y telomerasa, antígeno 1 tumoral de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrinaB2, CD22, factor de crecimiento insulínico (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina.

10 El antígeno tumoral puede comprender uno o más epítopos de cáncer antigénicos asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan un número de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de tejido tales como MART-1, 15 tirosinasa y gp100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación tales como el oncogén HER2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son los antígenos onco-fetales tales como el 20 antígeno carcinoembionario (CEA). En el linfoma de células B, la inmunoglobulina idiotípica específica de tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina realmente específico de tumor que es único para el tumor individual. Los 25 antígenos de diferenciación de células B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en linfoma de células B.

20 El antígeno tumoral puede ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Un TSA es único para las células tumorales y no se produce en otras células en el organismo. Un antígeno asociado TAA no es único para una célula tumoral, y en su lugar también se expresa en una célula normal en condiciones que no inducen un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor se puede producir en condiciones que permiten que el sistema inmunitario responda al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal, cuando el sistema inmunitario es inmaduro, e incapaz de responder o pueden ser antígenos que están normalmente presentes a niveles extremadamente bajos en células normales, pero que se expresan a niveles mucho más altos en células tumorales.

30 Los ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-1), gp 100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilinaje específicos de tumor tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios expresados en exceso tales como 35 CEA; oncogenes expresados en exceso y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, tales como los antígenos del virus de Epstein Barr EBVA y antígenos del papilomavirus humano (HPV) E6 y E7. Otros antígenos grandes basados en proteínas incluyen TSP-40, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, 45 CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, htgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, TA-90\proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

50 El antígeno (tal como el primer antígeno y/o el segundo antígeno) se puede seleccionar del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77.

3. Conectores peptídicos

55 Los diversos anticuerpos de dominio único en los CAR multiespecíficos o multivalentes descritos en el presente documento se pueden fusionar entre sí mediante conectores peptídicos. En algunas realizaciones, los anticuerpos de dominio único se fusionan directamente entre sí sin ningún conector peptídico. Los conectores peptídicos que conectan diferentes anticuerpos de dominio único pueden ser iguales o diferentes. También se pueden fusionar diferentes dominios de los CAR entre sí a través de conectores peptídicos.

Cada conector peptídico en un CAR puede tener la misma o diferente longitud y/o secuencia dependiendo de las características estructurales y/o funcionales de los anticuerpos de dominio único y/o los diversos dominios. Cada conector peptídico se puede seleccionar y optimizar independientemente. La longitud, el grado de flexibilidad y/u otras propiedades del conector o conectores peptídicos utilizados en los CAR pueden tener alguna influencia en las propiedades, incluyendo, pero sin limitarse a la afinidad, especificidad o avidez por uno o más antígenos o epítopos particulares. Por ejemplo, se pueden seleccionar conectores peptídicos más largos para asegurar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. Por ejemplo, en un CAR multivalente o multiespecífico que comprende anticuerpos de dominio único dirigidos contra un antígeno multimérico, la longitud y flexibilidad de los conectores peptídicos son preferiblemente tales que permiten que cada anticuerpo de dominio único en el CAR multivalente se una al determinante antigenógeno en cada una de las subunidades del multímero. En algunas realizaciones, se puede disponer un conector peptídico corto entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular de un CAR. En alguna realización, un conector peptídico comprende restos flexibles (tales como glicina y serina) de modo que los dominios adyacentes están libres para moverse uno con respecto al otro. Por ejemplo, un doblete de glicina-serina puede ser un conector peptídico adecuado.

15 El conector peptídico puede ser de cualquier longitud adecuada. En algunas realizaciones, el conector peptídico tiene al menos aproximadamente cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 o más aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente cualquiera de 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o menos aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la longitud del conector peptídico es cualquiera de aproximadamente 1 aminoácido a aproximadamente 10 aminoácidos, de aproximadamente 1 aminoácido a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 1 aminoácido a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 25 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, de aproximadamente 10 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, de aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, de aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos.

20 El conector peptídico puede tener una secuencia de origen natural, o una secuencia de origen no natural. Por ejemplo, se puede utilizar como el conector una secuencia derivada de la región bisagra de anticuerpos solo de cadena pesada. Véase, por ejemplo, el documento WO1996/34103. En algunas realizaciones, el conector peptídico es un conector flexible. Los conectores flexibles ilustrativos incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGS)_n, y (GGGGS)_n, en donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros conectores flexibles conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO: 144), (GGGGS)₂ (SEQ ID NO: 145), (GGGS)₄ (SEC ID NO:146), GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS (SEC ID NO: 147), GGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGS (SEC ID NO:148), (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 149), (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 150) o (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 151).

Dominio transmembrana

30 Los CAR de la presente invención comprenden un dominio transmembrana que se puede fusionar directa o indirectamente al dominio de unión a antígeno extracelular. El dominio transmembrana puede derivar de una fuente natural o sintética. Como se emplea en el presente documento, un "dominio transmembrana" se refiere a cualquier estructura proteica que sea termodinámicamente estable en una membrana celular, preferiblemente una membrana celular eucariótica. Los dominios transmembrana compatibles para su uso en los CAR descritos en el presente documento se pueden obtener a partir de una proteína de origen natural. Alternativamente, puede ser un segmento proteico sintético, no natural, p. ej., un segmento proteico hidrófobo que sea termodinámicamente estable en una membrana celular.

45 Los dominios transmembrana se clasifican basándose en la estructura tridimensional del dominio transmembrana. Por ejemplo, los dominios transmembrana pueden formar una hélice alfa, un complejo de más de una hélice alfa, un barril beta o cualquier otra estructura estable capaz de abarcar la bicapa de fosfolípidos de una célula. Además, los dominios transmembrana pueden clasificarse también o alternativamente basándose en la topología del dominio transmembrana, incluyendo el número de pases que el dominio transmembrana realiza a través de la membrana y la orientación de la proteína. Por ejemplo, las proteínas de membrana de un solo pase cruzan la membrana celular una vez, y las proteínas de membrana de múltiples pases cruzan la membrana celular al menos dos veces (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más veces). Las proteínas de membrana pueden definirse como de tipo I, tipo II o tipo III dependiendo de la topología de sus extremos y segmentos de pase de membrana con respecto al interior y el exterior de la célula. Las proteínas de membrana de tipo I tienen una única región que abarca la membrana y están orientadas de manera que el extremo N-terminal de la proteína esté presente en el lado extracelular de la bicapa lipídica de la célula y el extremo C-terminal de la proteína esté presente en el lado citoplasmático. Las proteínas de membrana de tipo II también tienen una única región que abarca la membrana, pero están orientadas de manera que el extremo C-terminal de la proteína esté presente en el lado extracelular de la bicapa lipídica de la célula y el extremo N-terminal de la proteína esté presente en el lado citoplasmático. Las proteínas de membrana de tipo III tienen múltiples segmentos que abarcan la membrana y pueden subclasicarse adicionalmente basándose en el número de segmentos transmembrana y la ubicación de los extremos N y C.

En algunas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR descrito en el presente documento deriva de una proteína de membrana unipaso de tipo I. En algunas realizaciones, los dominios transmembrana de proteínas de membrana multipaso también pueden ser compatibles para su uso en los CAR descritos en el presente documento. Las proteínas de membrana multipaso pueden comprender una estructura de lámina beta compleja (al menos 2, 3, 4,

5 5, 6, 7 o más) hélices alfa o una estructura de lámina beta. Preferiblemente, el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de una proteína de membrana multipaso están presentes en lados opuestos de la bicapa lipídica, p. ej., el extremo N-terminal de la proteína está presente en el lado citoplasmático de la bicapa lipídica y el extremo C-terminal de la proteína está presente en el lado extracelular.

10 En algunas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende un dominio transmembrana elegido entre el dominio transmembrana de una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD1 la, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, Nkp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD1B, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, 15 ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), ITBR, PAG/Cbp, Nkp44, Nkp30, Nkp46, NKG2D y/o NKG2C. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es el de una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD8a, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1.

20 En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es el de CD28. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de CD28 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana de CD28 está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 135.

25 En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es el de CD8a. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de CD8a que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 132. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana de CD8a está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 134.

30 Los dominios transmembrana para su uso en los CAR descritos en el presente documento también pueden comprender al menos una porción de un segmento de proteína sintética, no natural. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es una hélice alfa o lámina beta sintética, no natural. En algunas realizaciones, el segmento de proteína tiene al menos aproximadamente 20 aminoácidos, p. ej., al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más aminoácidos. Los ejemplos de dominios transmembrana sintéticos se conocen en la técnica, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Núm. 7.052.906 B1 y la Publicación PCT Núm. WO 2000/032776 A2.

35 El dominio transmembrana puede comprender una región transmembrana y una región citoplasmática localizada en el lado C-terminal del dominio transmembrana. La región citoplasmática del dominio transmembrana puede comprender tres o más aminoácidos y, en algunas realizaciones, ayuda a orientar el dominio transmembrana en la bicapa lipídica. En algunas realizaciones, uno o más restos de cisteína están presentes en la región transmembrana del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, uno o más restos de cisteína están presentes en la región citoplasmática del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, la región citoplasmática del dominio transmembrana comprende aminoácidos cargados positivamente. En algunas realizaciones, la región citoplasmática del dominio transmembrana comprende los aminoácidos arginina, serina y lisina.

40 En algunas realizaciones, la región transmembrana del dominio transmembrana comprende restos de aminoácidos hidrófobos. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende una secuencia hidrófoba artificial. Por ejemplo, puede estar presente un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en el extremo C-terminal terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, la región transmembrana comprende principalmente restos de aminoácidos hidrófobos, tales como alanina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o valina. En algunas realizaciones, la región transmembrana es hidrófoba. En algunas realizaciones, la región transmembrana comprende una secuencia de poli-leucina-alanina. La hidropatía, o características hidrófobas o hidrófilas de una proteína o segmento de proteína, se pueden evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, el análisis de hidropatía de Kyte y Doolittle.

Dominio de señalización intracelular

45 Los CAR de la presente invención comprenden un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula efectora inmunitaria que expresa los CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citocinas. Por tanto, el término dominio de señalización citoplasmático se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente puede emplearse el dominio de señalización citoplasmático completo, en muchos casos no es necesario utilizar la cadena completa. En la medida en que se utilice una porción truncada del dominio de señalización

citoplasmático, tal porción truncada se puede utilizar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, se pretende que el término dominio de señalización citoplasmático incluya cualquier porción truncada del dominio de señalización citoplasmático suficiente para transducir la señal de la función efectora.

- 5 En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria. En algunas realizaciones, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular que consiste esencialmente en un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria. "Dominio de señalización intracelular primario" se refiere a una secuencia de señalización citoplasmática que actúa de una manera estimuladora para inducir funciones efectoras inmunitarias. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario contiene un motivo de señalización conocido como motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor, o ITAM. Un "ITAM", como se emplea en el presente documento, es un motivo proteico conservado que está generalmente presente en la porción de cola de moléculas de señalización expresadas en muchas células inmunitarias. El motivo puede comprender dos repeticiones de la secuencia de aminoácidos YxxL/I separadas por 6-8 aminoácidos, en donde cada x es independientemente cualquier aminoácido, produciendo el motivo conservado YxxL/Ix(6-8)YxxL/I. Los ITAM dentro de las moléculas de señalización son importantes para la transducción de señales dentro de la célula, que está mediada al menos en parte por la fosforilación de restos de tirosina en el ITAM después de la activación de la molécula de señalización. Los ITAM también pueden funcionar como sitios de acoplamiento para otras proteínas implicadas en rutas de señalización. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que contiene ITAM ilustrativas incluyen las derivadas de CD3ζ, FcR gamma(FCER1G), FcR beta (Fc Epsilon Rib), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.
- 10 15 20 25 30
- En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular consiste en el dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es un dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ de tipo salvaje comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ de tipo salvaje está codificado por el ácido nucleico de SEQ ID NO: 142. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es un mutante funcional del dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ que contiene una o más mutaciones, tal como Q65K. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ mutante está codificado por el ácido nucleico de SEQ ID NO: 143.

Dominio de señalización coestimulador

- Muchas células efectoras inmunitarias requieren coestimulación, además de la estimulación de una señal específica de antígeno, para promover la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares, así como para activar las funciones efectoras de la célula. En algunas realizaciones, el CAR comprende al menos un dominio de señalización coestimulador. El término "dominio de señalización coestimulador", como se emplea en el presente documento, se refiere a al menos una porción de una proteína que media la transducción de señales dentro de una célula para inducir una respuesta inmunitaria tal como una función efectora. El dominio de señalización coestimulador del receptor químérico descrito en el presente documento puede ser un dominio de señalización citoplasmático de una proteína coestimuladora, que transduce una señal y modula las respuestas mediadas por células inmunitarias, tales como células T, linfocitos NK, macrófagos, neutrófilos o eosinófilos. El "dominio de señalización coestimulador" puede ser la porción citoplasmática de una molécula coestimuladora. El término "molécula coestimuladora" se refiere a un compañero de unión relacionado en una célula inmunitaria (tal como una célula T) que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo una respuesta coestimuladora por la célula inmunitaria, tal como, pero sin limitarse a, proliferación y supervivencia.
- 45 50 55 60
- En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un único dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende dos o más (tal como aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4 o más) dominios de señalización coestimuladores. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende dos o más de los mismos dominios de señalización coestimuladores, por ejemplo, dos copias del dominio de señalización coestimulador de CD28. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende dos o más dominios de señalización coestimuladores de diferentes proteínas coestimuladoras, tales como dos o más proteínas coestimuladoras cualesquiera descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario (tal como el dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ) y uno o más dominios de señalización coestimuladores. En algunas realizaciones, los uno o más dominios de señalización coestimuladores y el dominio de señalización intracelular primario (tal como el dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ) se fusionan entre sí a través de conectores peptídicos opcionales. El dominio de señalización intracelular primario y el uno o más dominios de señalización coestimuladores pueden disponerse en cualquier orden adecuado. En algunas realizaciones, los uno o más dominios de señalización coestimuladores están localizados entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular primario (tal como el dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ). Múltiples dominios de señalización coestimuladores pueden proporcionar efectos estimuladores aditivos o sinérgicos.

La activación de un dominio de señalización coestimulador en una célula anfítriona (p. ej., una célula inmunitaria) puede inducir a la célula a aumentar o disminuir la producción y secreción de citocinas, propiedades fagocíticas, proliferación, diferenciación, supervivencia y/o citotoxicidad. El dominio de señalización coestimulador de cualquier molécula coestimuladora puede ser compatible para su uso en los CAR descritos en el presente documento. El tipo o

5 los tipos de dominio de señalización coestimulador se seleccionan basándose en factores tales como el tipo de células efectoras inmunitarias en las que se expresarían las moléculas efectoras (p. ej., células T, células NK, macrófagos, neutrófilos o eosinófilos) y la función efectora inmunitaria deseada (p. ej., efecto ADCC). Los ejemplos de dominios de 10 señalización coestimuladores para su uso en los CAR pueden ser el dominio de señalización citoplasmático de proteínas coestimuladoras, incluyendo, sin limitación, miembros de la familia B7/CD28 (p. ej., B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2B7-DC, y PDCD6); miembros de la superfamilia de TNF (p. ej., 4-1BB/TNFSF9/CD137, Ligando 4-1BB/TNFSF9, BAFF/BLYS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, Ligando CD27/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, Ligando CD30/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, Ligando CD40/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, Ligando GITR/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, Linfoxina-alfa/TNF-beta, OX40/TNFRSF4, Ligando OX40/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-alfa y TNF RII/TNFRSF1B); miembros de la familia SLAM (p. ej., 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6 y SLAM/CD150); y cualquier otra molécula coestimuladora, tal como CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, 15 CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA Clase I, HLA-DR, Ikaros, Integrina alfa 4/CD49d, Integrina alfa 4 beta 1, Integrina alfa 4 beta 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, Dectina-1/CLEC7A, 20 DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, antígeno-1 asociado a la función linfocítica (LFA-1) y NKG2C.

En algunas realizaciones, los uno o más dominios de señalización coestimuladores se seleccionan del grupo que 25 consiste en CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, CD3, antígeno-1 asociado a la función linfocítica (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C y B7-H3.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular en el CAR de la presente invención comprende un dominio de señalización coestimulador de CD28. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ y un dominio de señalización coestimulador de CD28. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador 30 de CD28 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador de CD28 está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 138. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 228.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular en el CAR de la presente invención comprende un 35 dominio de señalización coestimulador de CD137 (es decir, 4-1BB). En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ y un dominio de señalización coestimulador de CD137. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador de CD137 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137. En algunas 40 realizaciones, el dominio de señalización coestimulador de CD137 está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 139.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular en el CAR de la presente invención comprende un dominio de señalización coestimulador de CD28 y un dominio de señalización coestimulador de CD137. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ, un dominio de señalización coestimulador de CD28, y un dominio de señalización coestimulador de CD137. En algunas 45 realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un polipéptido que comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un dominio de señalización coestimulador de CD28, un dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador de CD28 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador de CD28 está 50 codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 138. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador de CD137 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador de CD137 está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 139.

También dentro del alcance de la presente divulgación se encuentran variantes de cualquiera de los dominios de 55 señalización coestimuladores descritos en el presente documento, de modo que el dominio de señalización coestimulador sea capaz de modular la respuesta inmunitaria de la célula inmunitaria. En algunas realizaciones, los dominios de señalización coestimuladores comprenden hasta 10 variaciones de restos de aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 u 8) en comparación con un homólogo de tipo salvaje. Tales dominios de señalización coestimuladores que comprenden una o más variaciones de aminoácidos pueden denominarse variantes. La mutación de los restos de aminoácidos del dominio de señalización coestimulador puede dar como resultado un aumento en la transducción de 60 señalización y una estimulación potenciada de las respuestas inmunitarias con relación a los dominios de señalización coestimuladores que no comprenden la mutación. La mutación de los restos de aminoácidos del dominio de

señalización coestimulador puede dar como resultado una disminución en la transducción de señalización y una estimulación reducida de las respuestas inmunitarias con relación a los dominios de señalización coestimuladores que no comprenden la mutación.

Región bisagra

5 Los CAR de la presente invención pueden comprender un dominio bisagra que se localiza entre el dominio de unión a antígeno extracelular y el dominio transmembrana. Un dominio bisagra es un segmento de aminoácidos que se encuentra generalmente entre dos dominios de una proteína y puede permitir la flexibilidad de la proteína y el movimiento de uno o ambos dominios entre sí. Se puede utilizar cualquier secuencia de aminoácidos que proporcione tal flexibilidad y movimiento del dominio de unión a antígeno extracelular con respecto al dominio transmembrana de 10 la molécula efectora.

El dominio bisagra puede contener aproximadamente 10-100 aminoácidos, p. ej., aproximadamente uno cualquiera de 15-75 aminoácidos, 20-50 aminoácidos o 30-60 aminoácidos. En algunas realizaciones, el dominio bisagra puede tener al menos aproximadamente uno cualquiera de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 aminoácidos de longitud.

15 En algunas realizaciones, el dominio bisagra es un dominio bisagra de una proteína de origen natural. Los dominios bisagra de cualquier proteína conocida en la técnica que comprende un dominio bisagra son compatibles para su uso en los receptores químéricos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio bisagra es al menos una porción de un dominio bisagra de una proteína de origen natural y confiere flexibilidad al receptor químérico.

20 En algunas realizaciones, el dominio bisagra deriva de CD8α. En algunas realizaciones, el dominio bisagra es una porción del dominio bisagra de CD8α, p. ej., un fragmento que contiene al menos 15 (p. ej., 20, 25, 30, 35 o 40) aminoácidos consecutivos del dominio bisagra de CD8α. En algunas realizaciones, el dominio bisagra de CD8α comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130. En algunas realizaciones, el dominio bisagra de CD8α está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 131.

25 Los dominios bisagra de anticuerpos, tales como anticuerpos IgG, IgA, IgM, IgE o IgD, también son compatibles para su uso en los sistemas de receptores químéricos dependientes del pH descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio bisagra es el dominio bisagra que une los dominios constantes CH1 y CH2 de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio bisagra es de un anticuerpo y comprende el dominio bisagra del anticuerpo y una o más regiones constantes del anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio bisagra comprende el dominio bisagra de un anticuerpo y la región constante CH3 del anticuerpo. En algunas realizaciones, el dominio bisagra comprende el dominio bisagra de un anticuerpo y las regiones constantes CH2 y CH3 del anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgE o IgD. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, la región bisagra comprende la región bisagra y las regiones constantes CH2 y CH3 de un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, la región bisagra comprende la región bisagra y la región constante CH3 de un anticuerpo IgG1.

30 35 Los péptidos que no se producen de manera natural también se pueden utilizar como dominios bisagra para los receptores químéricos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio bisagra entre el extremo C-terminal del dominio de unión al ligando extracelular de un receptor de Fc y el extremo N-terminal del dominio transmembrana es un conector peptídico, tal como un conector (GxS)n, en donde x y n, independientemente pueden ser un número entero entre 3 y 12, que incluye 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más.

40 Péptido señal

45 Los CAR de la presente invención pueden comprender un péptido señal (también conocido como secuencia señal) en el extremo N-terminal del polipéptido. En general, los péptidos señal son secuencias peptídicas que dirigen un polipéptido al sitio deseado en una célula. En algunas realizaciones, el péptido señal dirige la molécula efectora a la ruta secretora de la célula y permitirá la integración y el anclaje de la molécula efectora en la bicapa lipídica. Los péptidos señal que incluyen secuencias señal de proteínas de origen natural o secuencias señal sintéticas de origen no natural, que son compatibles para su uso en los CAR descritos en el presente documento serán evidentes para un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el péptido señal deriva de una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD8α, receptor α de GM-CSF y cadena pesada de IgG1. En algunas realizaciones, el péptido señal deriva de CD8α. En algunas realizaciones, el péptido señal CD8α comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 127. En algunas realizaciones, el péptido señal CD8α está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 129.

IV. Células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética

50 Se proporcionan adicionalmente células efectoras inmunitarias que comprenden uno cualquiera de los CAR de la invención.

55 Una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería (tal como una célula T) puede comprender un receptor de antígeno químérico multivalente que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende una pluralidad de anticuerpos de dominio único (sdAb) que se unen específicamente a un

antígeno (tal como un antígeno tumoral); (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular. El antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. La pluralidad de sdAb puede ser de camélido, químérica, humana o humanizada. La pluralidad de anticuerpos de dominio único puede estar fusionada entre sí a través de enlaces peptídicos o conectores peptídicos. Cada conector peptídico puede tener no más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. El dominio transmembrana se puede seleccionar del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). El dominio de señalización intracelular primario puede derivar de CD3ζ. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador puede derivar de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. El polipéptido puede comprender del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ.

En algunas realizaciones, el CAR multivalente es monoespecífico. El CAR multivalente puede ser multiespecífico, tal como biespecífico. El CAR multivalente puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 198-201.

Una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética (tal como una célula T) puede comprender un receptor de antígeno químérico multivalente que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un primer epítopo de un antígeno (tal como un antígeno tumoral) y un segundo anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un segundo epítopo del antígeno; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer epítopo y el segundo epítopo son diferentes. El antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. El primer sdAb y/o el segundo sdAb pueden ser de camélido, químicos, humanos o humanizados. El primer anticuerpo de dominio único y el segundo anticuerpo de dominio único pueden fusionarse entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. El conector peptídico puede tener no más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. El dominio transmembrana se puede seleccionar del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). El dominio de señalización intracelular primario puede derivar de CD3ζ. El dominio de señalización intracelular puede ser un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador puede derivar de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. El CAR multivalente puede comprender adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. El polipéptido puede comprender del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética puede ser una célula T, una célula NK, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente o una célula madre embrionaria. La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética puede ser autóloga. La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética puede ser alogénica.

En algunas realizaciones, se proporciona una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética (tal como una célula T) que comprende un CAR de BCMA de la invención que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer y un segundo sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer sdAb anti-BCMA comprende:

una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; y el segundo sdAb anti-BCMA comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA es de camélido, químérico, humano o humanizado. En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 80 y 87. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T).

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3ζ. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y sus combinaciones.

- 5 En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas 10 realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD28, un primer dominio de señalización coestimulador de CD28, un segundo dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del 15 extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 265-270. En algunas 20 realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es una célula T, una célula NK, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente o una célula madre embrionaria. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es autóloga. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es alogénica.

También se proporcionan células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética que comprenden (o expresan) dos o más CAR diferentes. Dos o más cualesquiera de los CAR descritos en el presente documento se pueden expresar combinados. Los CAR se pueden dirigir a diferentes antígenos, proporcionando de este modo efectos sinérgicos o aditivos. Puesto que los anticuerpos de dominio único en los dominios de unión a antígeno extracelulares de los CAR tienen solo cadenas variables de antígeno único (tales como cadenas pesadas), tales células que expresan CAR no tienen problemas de emparejamiento incorrecto de cadenas variables, como se observa en las células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética que coexpresan dos o más CAR basados en scFv. Las células efectoras inmunitarias modificadas ilustrativas que coexpresan dos CAR basados en V_H se ilustran en la 25 FIG. 1E. Un experto en la técnica reconocería que los CAR basados en otros sdAb o que tienen otras estructuras 30 como se describe en el presente documento también pueden coexpresarse en las células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética. Los dos o más CAR pueden codificarse en el mismo vector o en vectores diferentes.

La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética puede expresar adicionalmente una o más 35 proteínas terapéuticas y/o inmunomoduladores, tales como inhibidores del punto de control inmunitario. Véanse, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Internacional Núm. PCT/CN2016/073489 y PCT/CN2016/087855.

Vectores

La presente invención proporciona vectores para clonar y expresar uno cualquiera de los CAR de la invención. En 40 algunas realizaciones, el vector es adecuado para replicación e integración en células eucarióticas, tales como células de mamífero. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores lentivirales, vectores retrovirales, vector vaccinia, vector viral de herpes simple y derivados de los mismos. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y es descrita, por ejemplo, por Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular.

45 Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia génica a células de mamífero. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes. El ácido nucleico heterólogo puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando mecanismos conocidos en la técnica. El virus recombinante se puede aislar y suministrarse después a la célula de mamífero modificada mediante ingeniería genética *in vitro* o *ex vivo*. Se conocen en la técnica varios sistemas retrovirales. En algunas 50 realizaciones, se utilizan vectores de adenovirus. Se conocen en la técnica varios vectores de adenovirus. En algunas realizaciones, se utilizan vectores de lentivirus. En algunas realizaciones, se utilizan vectores lentivirales autoinactivantes. Por ejemplo, los vectores lentivirales autoinactivantes que portan la secuencia codificante del inmunomodulador (tal como el inhibidor del punto de control inmunitario) y/o los vectores lentivirales autoinactivantes que portan receptores de antígeno químicos se pueden empaquetar mediante protocolos conocidos en la técnica. 55 Los vectores lentivirales resultantes se pueden utilizar para transducir una célula de mamífero (tal como células T humanas primarias) utilizando métodos conocidos en la técnica. Los vectores derivados de retrovirus tales como lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células de progenie. Los vectores lentivirales también tienen baja inmunogenicidad, y pueden transducir células no proliferativas.

En algunas realizaciones, el vector comprende uno cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican un CAR de la invención. El ácido nucleico puede clonarse en el vector utilizando cualquier método de clonación molecular conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el uso de sitios de endonucleasa de restricción y uno o más marcadores seleccionables. En algunas realizaciones, el ácido nucleico está conectado operablemente a un promotor. Se han explorado variedades de promotores para la expresión génica en células de mamífero, y se puede utilizar cualquiera de los promotores conocidos en la técnica en la presente invención. Los promotores pueden clasificarse aproximadamente como promotores constitutivos o promotores regulados, tales como promotores inducibles.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el CAR está conectado operablemente a un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos permiten que los genes heterólogos (también denominados transgenes) se expresen constitutivamente en las células anfítrionas. Los promotores constitutivos ilustrativos contemplados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, promotores de Citomegalovirus (CMV), factores de elongación humanos-1alfa (hEF1a), promotor de ubiquitina C (UbiC), promotor de fosfogliceroquinasa (PGK), promotor temprano del virus de simio 40 (SV40) y promotor de β-actina de pollo acoplado con potenciador temprano de CMV (CAGG). Las eficiencias de tales promotores constitutivos en la conducción de la expresión transgénica se han comparado ampliamente en un gran número de estudios. Por ejemplo, Michael C. Milone *et al* compararon las eficiencias de CMV, hEF1a, UbiC y PGK para dirigir la expresión del receptor de antígeno químérico en células T humanas primarias, y concluyeron que el promotor hEF1a no solo indujo el nivel más alto de expresión transgénica, sino que también se mantuvo óptimamente en las células T humanas CD4 y CD8 (*Molecular Therapy*, 17(8): 1453-1464 (2009)). En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el CAR está conectado operablemente a un promotor hEF1a.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el CAR está conectado operablemente a un promotor inducible. Los promotores inducibles pertenecen a la categoría de promotores regulados. El promotor inducible puede inducirse mediante una o más condiciones, tales como una condición física, microentorno de la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética, o el estado fisiológico de la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética, un inductor (es decir, un agente inductor), o una combinación de los mismos. Las condiciones inductoras pueden no inducir la expresión de genes endógenos en la célula de mamífero modificada mediante ingeniería genética, y/o en el sujeto que recibe la composición farmacéutica. Las condiciones inductoras se pueden seleccionar del grupo que consiste en: inductor, irradiación (tal como radiación ionizante, luz), temperatura (tal como calor), estado redox, entorno tumoral y el estado de activación de la célula de mamífero modificada mediante ingeniería genética.

En algunas realizaciones, el vector también contiene un gen marcador seleccionable o un gen informador para seleccionar células que expresan el CAR de la población de células anfítrionas transfectadas a través de vectores lentivirales. Tanto los marcadores seleccionables como los genes informadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células anfítrionas. Por ejemplo, el vector puede contener terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de las secuencias de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el vector comprende más de un ácido nucleico que codifica los CAR. En algunas realizaciones, el vector comprende un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer CAR y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo CAR, en donde el primer ácido nucleico está conectado operablemente al segundo ácido nucleico a través de una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de autoescisión. En algunas realizaciones, el péptido de autoescisión se selecciona del grupo que consiste en T2A, P2A y F2A. En algunas realizaciones, el péptido T2A tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 254. En algunas realizaciones, el péptido T2A está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 255.

Células efectoras inmunitarias

Las "células efectoras inmunitarias" son células inmunitarias que pueden realizar funciones efectoras inmunitarias. En algunas realizaciones, las células efectoras inmunitarias expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de células efectoras inmunitarias que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas, neutrófilos y eosinófilos.

En algunas realizaciones, las células efectoras inmunitarias son células T. En algunas realizaciones, las células T son CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, las células T producen IL-2, TNF y/o TNF tras expresar el CAR y unirse a las células diana, tales como células tumorales CD20+ o CD19+. En algunas realizaciones, las células T CD8+ lisan células diana específicas de antígeno tras expresar el CAR y unirse a las células diana.

En algunas realizaciones, las células efectoras inmunitarias son células NK. En otras realizaciones, las células efectoras inmunitarias pueden establecerse en líneas celulares, por ejemplo, células NK-92.

En algunas realizaciones, las células efectoras inmunitarias se diferencian de una célula madre, tal como una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una iPS o una célula madre embrionaria.

Las células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética se preparan introduciendo los CAR en las células efectoras inmunitarias, tales como las células T. El CAR se puede introducir en las células efectoras inmunitarias transfectando uno cualquiera de los ácidos nucleicos aislados o uno cualquiera de los vectores descritos en la Sección III. El CAR se puede introducir en las células efectoras inmunitarias insertando proteínas en la membrana celular mientras se pasan las células a través de un sistema microfluídico, tal como CELL SQUEEZE® (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20140287509).

Los métodos para introducir vectores o ácidos nucleicos aislados en una célula de mamífero son conocidos en la técnica. Los vectores descritos se pueden transferir a una célula efectora inmunitaria mediante métodos físicos, químicos o biológicos.

10 Los métodos físicos para introducir el vector en una célula efectora inmunitaria incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofeción, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. El vector se puede introducir en la célula mediante electroporación.

15 Los métodos biológicos para introducir el vector en una célula efectora inmunitaria incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales se han convertido en el método más ampliamente utilizado para insertar genes en células de mamífero, p. ej., humanas.

20 Los medios químicos para introducir el vector en una célula efectora inmunitaria incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, cuentas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ilustrativo para su uso como vehículo de suministro *in vitro* es un liposoma (p. ej., una vesícula de membrana artificial).

25 Las moléculas de ARN que codifican cualquiera de los CAR descritos en el presente documento se pueden preparar mediante un método convencional (p. ej., transcripción *in vitro*) e introducir después en las células efectoras inmunitarias mediante métodos conocidos tales como electroporación de ARNm. Véase, p. ej., Rabinovich et al., Human Gene Therapy 17:1027-1035.

30 La célula efectora inmunitaria transducida o transfectada se puede propagar *ex vivo* después de la introducción del vector o ácido nucleico aislado. La célula efectora inmunitaria transducida o transfectada se puede cultivar para propagarse durante al menos aproximadamente cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días o 14 días. La célula efectora inmunitaria transducida o transfectada se puede evaluar o escrutar adicionalmente para seleccionar la célula de mamífero modificada mediante ingeniería genética.

35 Los genes informadores se pueden utilizar para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen informador es un gen que no está presente en o es expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, p. ej., actividad enzimática. La expresión del gen informador se somete a ensayo en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes informadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína fluorescente verde (p. ej., Ui-Tei et al. FEBS Letters 479: 79-82 (2000)). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y se pueden preparar utilizando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente.

40 Otros métodos para confirmar la presencia del ácido nucleico que codifica los CAR en la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética incluyen, por ejemplo, ensayos biológicos moleculares bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos bioquímicos, tales como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, p. ej., por métodos inmunológicos (tales como ELISA y transferencias Western).

45 **1. Fuentes de células T (La sección "Fuentes de células T" se divulga como referencia. Las realizaciones en esta sección no son realizaciones de la invención).**

50 Antes de la expansión y modificación genética de las células T, se obtiene una fuente de células T de un individuo. Las células T se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En algunas realizaciones, se puede utilizar cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica. En algunas realizaciones, las células T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre recolectada de un sujeto utilizando cualquier número de mecanismos conocidos por el experto en la técnica, tales como separación en Ficoll™. En algunas realizaciones, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En algunas realizaciones, las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para etapas de procesamiento posteriores. En algunas realizaciones, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas realizaciones, la solución de lavado carece de calcio y puede

- carecer de magnesio o puede carecer de muchos, sino de todos, los cationes divalentes. De nuevo, sorprendentemente, las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio conducen a un aumento de activación. Como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, se puede realizar una etapa de lavado mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como utilizando una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, Baxter CytoMate, o Haemonetics Cell Saver 5) según las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libre de Ca^{2+} , libre de Mg^{2+} , PlasmaLyte A, u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden ser eliminados y las células resuspendidas directamente en medios de cultivo.
- En algunas realizaciones, las células T se aíslan de linfocitos de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o por elutriación centrífuga a contraflujo. Una subpoblación específica de células T, tal como células T CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+, se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células T se aíslan mediante incubación con cuentas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un periodo de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, el periodo de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros intermedios. En una realización adicional, el periodo de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es de 10 a 24 horas. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de células T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más largos, tales como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular. Se pueden utilizar tiempos de incubación más largos para aislar células T en cualquier situación en la que haya pocas células T en comparación con otros tipos celulares, por ejemplo, aislando linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunodeprimidos. Adicionalmente, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficacia de captura de células T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo que se permite que las células T se unan a las cuentas de CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la razón de cuentas a células T (como se describe adicionalmente en el presente documento), las subpoblaciones de células T se pueden seleccionar preferiblemente al inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el procedimiento. Adicionalmente, aumentando o disminuyendo la proporción de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las cuentas u otra superficie, las subpoblaciones de células T se pueden seleccionar preferiblemente al inicio del cultivo o en otros puntos de tiempo deseados. El experto en la técnica reconocería que también se pueden utilizar múltiples rondas de selección. En algunas realizaciones, puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el procedimiento de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también se pueden someter a rondas adicionales de selección.
- El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede conseguir con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales incluye típicamente anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En ciertas realizaciones, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente células T reguladoras que expresan normalmente CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ y FoxP3+. Alternativamente, en ciertas realizaciones, las células reguladoras T se agotan mediante cuentas conjugadas con anti-C25 u otro método de selección similar.
- Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y la superficie (p. ej., partículas tales como cuentas) se pueden variar. En ciertas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las cuentas y las células se mezclan entre sí (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las cuentas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una realización, se utiliza una concentración de mil millones de células/ml. En una realización adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular. Adicionalmente, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como células T negativas para CD28, o de muestras en donde hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y serían deseables de obtener. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.
- En algunas realizaciones, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Diluyendo significativamente la mezcla de células T y la superficie (p. ej., partículas tales como cuentas), las interacciones entre las partículas y las células se minimizan. Esto selecciona las células que expresan altas cantidades de antígenos deseados que se unirán a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4+ expresan niveles más altos de CD28 y se

capturan más eficazmente que las células T CD8+ en concentraciones diluidas. En algunas realizaciones, la concentración de células utilizada es de 5×10^6 /ml. En algunas realizaciones, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml, y cualquier valor entero entre ellos.

5 En algunas realizaciones, las células pueden incubarse en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables a 2-10°C o a temperatura ambiente.

Las células T para estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme eliminando granulocitos y, en cierta medida, monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células se pueden suspender en una solución de congelación. Aunque se conocen en la técnica muchas soluciones y parámetros de congelación y serán útiles en este contexto, un método implica utilizar PBS que contiene DMSO al 20% y albúmina de suero humano al 8%, o medios de cultivo que contienen Dextrano 40 al 10% y Dextrosa al 5%, Albúmina de suero humano al 20% y DMSO al 7,5%, o Plasmalyte-A al 31,25%, Dextrosa al 5%, NaCl al 0,45%, Dextrano 40 al 10% y Dextrosa al 5%, Albúmina de suero humano al 20% y DMSO al 7,5% u otros medios de congelación celular adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y Plasmalyte A, las células 10 se congelan después a -80°C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como 15 congelación incontrolada inmediatamente a -20°C o en nitrógeno líquido.

En algunas realizaciones, las células crioconservadas se descongelan y lavan como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación.

20 También se divulga como referencia la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior al momento en el que podrían ser necesarias las células expandidas como se describe en el presente documento. Como tal, la fuente de las células que se van a expandir se puede recoger en cualquier momento necesario, y las células deseadas, tales como las células T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior 25 en la terapia de células T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia de células T, tales como las descritas en el presente documento. En una realización, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En ciertas realizaciones, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y se congelan para su uso posterior. En ciertas realizaciones, las células T pueden expandirse, congelarse y utilizarse en un momento posterior. En ciertas realizaciones, se recogen 30 muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe en el presente documento, pero antes de cualquier tratamiento. En una realización adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo pero sin limitarse a tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, 35 anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En una realización adicional, las células 40 se aíslan para un paciente y se congelan para su uso posterior junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) del trasplante de médula ósea o células madre, la terapia ablativa de células T utilizando agentes quimioterapéuticos tales como fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las células se aíslan antes de y pueden congelarse para su uso posterior para el tratamiento después de la terapia ablativa de células B, tal como agentes que reaccionan con CD20, 45 p. ej., Rituxan.

En algunas realizaciones, las células T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento. A este respecto, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en donde los pacientes 50 normalmente se están recuperando del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima o mejorada por su capacidad para expandirse ex vivo. Asimismo, después de la manipulación ex vivo utilizando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para un injerto potenciado y una expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención recoger células sanguíneas, incluyendo células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Adicionalmente, en ciertas realizaciones, se pueden utilizar regímenes de movilización (por ejemplo, 55 movilización con GM-CSF) y acondicionamiento para crear condiciones en un sujeto en donde se favorece la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos celulares particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Los tipos de células ilustrativos incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

2. Activación y expansión de células T (La sección "Activación y expansión de células T" se divulga como referencia. Las realizaciones en esta sección no son realizaciones de la invención).

Ya sea antes o después de la modificación genética de las células T con los CAR descritos en el presente documento, las células T se pueden activar y expandir generalmente utilizando métodos como se describe, por ejemplo, en las 5 Patentes de Estados Unidos Núm. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20060121005.

Generalmente, las células T se pueden expandir por contacto con una superficie que tenga anclada a la misma un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora sobre la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T se pueden estimular como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (p. ej., briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria sobre la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de 10 células T se puede poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de células T CD4+ o células T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B- 15 T3, XR-CD28 (Diacclone, Besancon, Francia) y se pueden utilizar otros métodos conocidos comúnmente en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227 (1-2): 53-63, 1999).

En algunas realizaciones, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para la célula T pueden ser proporcionadas por diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden acoplarse a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Alternativamente, 20 un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En una realización, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En ciertas realizaciones, ambos agentes pueden estar en solución. En otra realización, los agentes pueden estar en forma soluble, y después entrecruzarse con una superficie, tal como una célula que expresa receptores de Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 30 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de células T en la presente invención.

En algunas realizaciones, las células T se combinan con cuentas recubiertas con agente, las cuentas y las células se separan posteriormente, y después las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, las cuentas recubiertas con agente y las células no se separan, sino que se cultivan juntas. En una realización adicional, las 35 cuentas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, dando como resultado una mayor ligación de marcadores de superficie celular, induciendo de ese modo la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular se pueden ligar permitiendo que las cuentas paramagnéticas 40 a las que se anclan anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 cuentas) entren en contacto con las células T. En una realización, las células (por ejemplo, 10⁴ a 10⁹ células T) y las cuentas (por ejemplo, DYNABEADS® cuentas paramagnéticas M-450 CD3/CD28 T a una razón de 1:1) se combinan en un tampón, preferiblemente PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier 45 concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo 0,01% de la muestra o toda la muestra (es decir, 100%) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y las células se mezclan entre sí (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, en una 50 realización, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otra realización, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular. Adicionalmente, el uso de concentraciones celulares 55 altas permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como células T negativas para CD28. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertas realizaciones. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En algunas realizaciones, la mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario intermedio. En otra realización, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En una realización de la invención, las cuentas y las células T se cultivan juntas durante aproximadamente ocho días. En otra realización, las cuentas y las células T se cultivan juntas durante 2-3 días.

5 También pueden desecharse varios ciclos de estimulación de manera que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (p. ej., medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (p. ej., suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ y TNF-α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptopropionato. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio, y vitaminas, libres de suero o complementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocinas suficiente para el crecimiento y expansión de células T. Se incluyen antibióticos, p. ej. penicilina y la estreptomicina solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que van a infundirse en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (p. ej., 37°C) y atmósfera (p. ej., aire más 5% de CO₂). Las células T que se han expuesto a diversos tiempos de estimulación pueden exhibir diferentes características. Por ejemplo, los productos de células mononucleares de sangre típica o de sangre periférica sometida a aféresis tienen una población de células T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (TC, CD8). La expansión ex vivo de las células T estimulando los receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en células TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de células T comprende una población cada vez mayor de células TC. Por consiguiente, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajosa la infusión de un sujeto con una población de células T que comprende predominantemente células TH. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de células TC puede ser beneficioso expandir este subconjunto en mayor grado.

Por otra parte, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por tanto, tal reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de células T activadas para fines específicos.

30 V. Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden una cualquiera de las células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética que comprenden uno cualquiera de los CAR de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mezclando una pluralidad de células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética que tienen el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. 1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, metionina, Vitamina E, metabisulfito de sodio; conservantes, isotonificantes, estabilizantes, complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); agentes quelantes tales como EDTA y/o tensioactivos no iónicos.

Se utilizan tampones para controlar el pH en un rango que optimiza la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad depende del pH. Los tampones están presentes preferiblemente a concentraciones que oscilan de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes tamponadores adecuados para su uso con la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los tampones pueden comprender sales de histidina y trimetilamina tales como Tris.

Se añaden conservantes para retrasar el crecimiento microbiano, y están típicamente presentes en un rango de 0,2% a 1,0% (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (p. ej., cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de benzalconio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

Los agentes de tonicidad, a veces conocidos como "estabilizantes" están presentes para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se utilizan con biomoléculas grandes cargadas tales como proteínas y anticuerpos, a menudo se denominan "estabilizantes" porque pueden interaccionar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, disminuyendo de ese modo el potencial de interacciones inter- e intramoleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad entre 0,1% y 25% en peso, preferiblemente 1 y 5%, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes. Los agentes de tonicidad preferidos incluyen alcoholes de azúcar polihidroxilados, preferiblemente alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabinol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes: (1) agentes de voluminizantes, (2) potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizantes y (4) y agentes que previenen la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Tales excipientes incluyen: alcoholes de azúcar polihidroxilados (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositosa, mioinositol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (p. ej., inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α-monotioglicerol y sulfato sódico; proteínas de bajo peso molecular tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (p. ej., xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos (p. ej., lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Los tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") están presentes para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, lo que también permite que la formulación se exponga a tensión superficial de cizallamiento sin provocar la desnaturalización de la proteína o anticuerpo terapéuticos activos. Los tensioactivos no iónicos están presentes en un rango de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles PLURONIC®, TRITÓN®, monoéteres de polioxietilensorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®- 80, etc.), lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Los detergentes aniónicos que se pueden utilizar incluyen laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.

Para que las composiciones farmacéuticas se usen para administración in vivo, deben ser estériles. La composición farmacéutica puede hacerse estéril por filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones farmacéuticas del presente documento generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración es conforme a métodos conocidos y aceptados, tales como mediante bolo o infusión simple o múltiple durante un largo periodo de tiempo de una manera adecuada, p. ej., inyección o infusión por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, inhalación o por medios de liberación sostenida o liberación prolongada.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el antagonista, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos Núm. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y de etil-L-glutamato, de acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden contener más de un compuesto o agente activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Alternativamente, o, además, la composición puede comprender un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, citocina, agente inmunosupresor o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están presentes adecuadamente combinadas en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divultan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18^a edición.

VI. Usos en métodos para tratar el cáncer

La presente invención proporciona adicionalmente un CAR o una composición farmacéutica de la invención para su uso en métodos de inmunoterapia celular. En algunas realizaciones, la inmunoterapia celular es para tratar el cáncer, incluyendo, pero sin limitación, neoplasias hematológicas y tumores sólidos. Cualquiera de los anticuerpos de dominio único, receptores de antígeno químéricos y células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética descritos en el presente documento se puede utilizar en el método de tratamiento del cáncer. Los CAR descritos en el

presente documento pueden ser útiles para tratar tumores que tienen mutaciones de escape por pérdida de antígeno, y para reducir la resistencia a las terapias existentes. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden utilizar en métodos para tratar otras enfermedades que están asociadas con los antígenos reconocidos específicamente por los anticuerpos de dominio único o CAR, incluyendo, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias.

Se divulga como referencia un método para tratar un cáncer en un individuo (tal como un individuo humano), que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende: (1) una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética (tal como una célula T) que comprende un receptor de antígeno quimérico multivalente que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende una pluralidad de anticuerpos de dominio único (sdAb) que se unen específicamente a un antígeno (tal como un antígeno tumoral); (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular; y (2) un portador farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. En algunos ejemplos, la pluralidad de sdAb es de camélido, químérica, humana o humanizada. En algunos ejemplos, la pluralidad de anticuerpos de dominio único se fusiona entre sí a través de enlaces peptídicos o conectores peptídicos. En algunos ejemplos, cada conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunos ejemplos, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunos ejemplos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunos ejemplos, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunos ejemplos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunos ejemplos, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunos ejemplos, el CAR multivalente comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunos ejemplos, el CAR multivalente comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunos ejemplos, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. En algunos ejemplos, el CAR multivalente comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 198-201 y 265-270. En algunos ejemplos, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es autóloga. En algunos ejemplos, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es alogéntica. En algunos ejemplos, el cáncer es un cáncer líquido, tal como mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica. En algunos ejemplos, el cáncer es un cáncer sólido.

Se divulga como referencia un método para tratar un cáncer en un individuo (tal como un individuo humano), que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende: (1) una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética (tal como una célula T) que comprende un receptor de antígeno quimérico multivalente que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un primer epítopo de un antígeno (tal como un antígeno tumoral), y un segundo anticuerpo de dominio único que se une específicamente a un segundo epítopo del antígeno; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular, en donde el primer epítopo y el segundo epítopo son diferentes; y (2) un portador farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, BCMA, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3, y glicolípido F77. En algunos ejemplos, el primer sdAb y/o el segundo sdAb son de camélido, químicos, humanos o humanizados. En algunos ejemplos, el primer anticuerpo de dominio único y el segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí a través de un enlace peptídico o un conector peptídico. En algunos ejemplos, el conector peptídico no tiene más de aproximadamente 50 (tal como no más de aproximadamente uno cualquiera de 35, 25, 20, 15, 10 o 5) aminoácidos de longitud. En algunos ejemplos, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1. En algunos ejemplos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T). En algunos ejemplos, el dominio de señalización intracelular primario deriva de CD3ζ. En algunos ejemplos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunos ejemplos, el dominio de señalización coestimulador deriva de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, Ligandos de CD83 y sus combinaciones. En algunos ejemplos, el CAR multivalente comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunos ejemplos, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8α, el dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio de señalización coestimulador derivado de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario derivado de CD3ζ. En algunos ejemplos, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es autóloga. En algunos ejemplos, la célula efectora inmunitaria modificada

mediante ingeniería genética es alogénica. En algunos ejemplos, el cáncer es un cáncer líquido, tal como mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica. En algunos ejemplos, el cáncer es un cáncer sólido.

5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método para tratar un cáncer en un individuo (tal como un individuo humano) en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende: (1) una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética (tal como una célula T) que comprende un CAR de BCMA que comprende un polipéptido que comprende: (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer y un segundo sdAb anti-BCMA; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular; y (2) un portador farmacéuticamente aceptable, en donde el primer sdAb anti-BCMA comprende:

una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31; y en donde el segundo sdAb anti-BCMA comprende

15 una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

20 En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA es de camélido, quimérico, humano o humanizado. En algunas realizaciones, el sdAb anti-BCMA comprende un dominio V_HH que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en SEQ ID NO: 80 y 87. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria (tal como una célula T).

25 En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular primario es el de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador es el de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y sus combinaciones.

30 25 En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un dominio bisagra (tal como un dominio bisagra de CD8 α) localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana. En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende adicionalmente un péptido señal (tal como un péptido señal CD8 α) localizado en el extremo N-terminal del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , el

35 30 dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD28, un primer dominio de señalización coestimulador de CD28, un segundo dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el polipéptido comprende del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8 α , el dominio de unión a antígeno extracelular, un

40 35 dominio bisagra de CD8 α , un dominio transmembrana de CD8 α , un dominio de señalización coestimulador de CD137 y un dominio de señalización intracelular primario de CD3 ζ . En algunas realizaciones, el CAR de BCMA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 265-270. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es autóloga. En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es alogénica. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer líquido, tal como mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda o leucemia

45 40 linfocítica crónica. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer sólido.

Se divulga como referencia un método para tratar una enfermedad (tal como cáncer) en un individuo (tal como un individuo humano), que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de dominio único anti-BCMA y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde el sdAb anti-BCMA comprende uno cualquiera de los siguientes:

50 45 (1) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 18; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29;

55 50 (2) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;

(3) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;

55 55 (4) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;

(5) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;

5 (6) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;

(7) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;

10 (8) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

15 (9) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

(10) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; o

20 (11) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39.

En algunos ejemplos, el sdAb anti-BCMA comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78-88.

25 Los métodos descritos en el presente documento son adecuados para tratar diversos cánceres, incluyendo tanto cáncer sólido como cáncer líquido. Los métodos son aplicables a cánceres de todas las fases, incluyendo la etapa temprana, la etapa avanzada y el cáncer metastásico. Los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar como una primera terapia, segunda terapia, tercera terapia o terapia combinada con otros tipos de terapias para el cáncer conocidas en la técnica, tales como quimioterapia, cirugía, radiación, terapia génica, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, trasplante de células madre, terapia dirigida, crioterapia, terapia de ultrasonidos, terapia fotodinámica, ablación por radiofrecuencia o similares, en un entorno adyuvante o un entorno neoadyuvante.

30 La administración de las composiciones farmacéuticas puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones pueden administrarse a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra sistémicamente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a un individuo por infusión, tal como infusión intravenosa. Los mecanismos de infusión para inmunoterapia son conocidos en la técnica (véase, p. ej., Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676 (1988)). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a un individuo mediante inyección intradérmica o subcutánea. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por inyección intravenosa. En algunas realizaciones, las composiciones se inyectan directamente a un tumor, o un ganglio linfático. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra localmente a un sitio del tumor, tal como directamente a células tumorales, o a un tejido que tiene células tumorales.

35 El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia maligna agresiva en plasma incurable, que se clasifica como neoplasia de células B y prolifera en un método incontrolable en la médula ósea, interfiriendo con la producción metabólica normal de células sanguíneas y causando lesiones óseas dolorosas (Garfall, A.L. et al., *Discovery Med.* 2014, 17, 37). El mieloma múltiple puede presentarse clínicamente con hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia, lesiones óseas, infecciones bacterianas, hiperviscosidad y amiloidosis (Robert Z. Orlowski, *Cancer Cell.* 2013, 24(3)). Según la investigación y la estadística, se diagnosticará a casi 86.000 pacientes cada año de mieloma, y mientras, aproximadamente 63.000 pacientes mueren cada año por las complicaciones relacionadas con la enfermedad (Becker, 2011). Debido a una población envejecida, se pronostica que el número de casos de mieloma aumentará año a año.

40 Como muchos cánceres, no hay causa conocida de mieloma múltiple, y no hay cura. Algunos tratamientos para el mieloma múltiple son similares a los tratamientos para otros cánceres, tales como quimioterapia o radioterapia, trasplante de células madre o trasplante de médula ósea, terapia dirigida o terapia biológica (George, 2014). Las inmunoterapias celulares basadas en anticuerpos han demostrado un beneficio clínico sustancial para pacientes con neoplasias hematológicas, en particular en linfoma no Hodgkin de células B. Existe la necesidad de un agente inmunoterapéutico eficaz para tratar el mieloma múltiple.

Las dosificaciones y la concentración de fármaco deseada de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiadas está dentro del conocimiento práctico de un experto en la técnica. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para terapia humana. El aumento o disminución a escala interespecie de las dosis eficaces se puede realizar siguiendo los principios establecidos por Mordini, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", En *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, pág. 42-46. Está dentro del alcance de la presente invención que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y que la administración destinada a tratar un órgano o tejido específico puede necesitar el suministro de una manera diferente de la de otro órgano o tejido.

Como referencia, cuando la composición farmacéutica comprende uno cualquiera de los anticuerpos de dominio único descritos en el presente documento, la composición farmacéutica se administra a una dosificación de aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del individuo o más al día, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporcionan directrices sobre dosificaciones y métodos de suministro particulares; véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212.

En algunas realizaciones, cuando la composición farmacéutica comprende una cualquiera de las células inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética de la invención, la composición farmacéutica se administra a una dosificación de al menos aproximadamente cualquiera de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o 10^9 células/kg de peso corporal del individuo. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a una dosificación de cualquiera de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 , de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 , de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 , de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 , de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^9 , de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 , de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 , de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 , o de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^7 células/kg de peso corporal del individuo.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra una sola vez. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra múltiples veces (tal como cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6 o más veces). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez al mes, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, una vez cada 7 meses, una vez cada 8 meses, una vez cada 9 meses o una vez al año. En algunas realizaciones, el intervalo entre administraciones es aproximadamente uno cualquiera de 1 semana a 2 semanas, 2 semanas a 1 mes, 2 semanas a 2 meses, 1 mes a 2 meses, 1 mes a 3 meses, 3 meses a 6 meses, o 6 meses a un año. La dosificación y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente particular pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica de la medicina realizando un seguimiento del paciente en busca de signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

Por otra parte, las dosificaciones se pueden administrar mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

VII. Kits y artículos de fabricación

Se proporcionan adicionalmente kits, dosificaciones unitarias y artículos de fabricación que comprenden cualquiera de los receptores de antígeno químéricos, o las células efectoras inmunitarias modificadas mediante ingeniería genética de la invención. En algunas realizaciones, se proporciona un kit que contiene una cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención y preferiblemente proporciona instrucciones para su uso.

Los kits de la presente invención están en un envase adecuado. El envase adecuado incluye, pero no se limita a, viales, botellas, frascos, envases flexibles (p. ej., bolsas Mylar o de plástico selladas) y similares. Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. La presente invención proporciona también por tanto artículos de fabricación, que incluyen viales (tales como viales sellados), botellas, frascos, envases flexibles y similares.

El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Generalmente, el recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar una enfermedad o trastorno (tal como cáncer) descritos en el presente documento, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indican que la composición se utiliza para tratar la afección particular en un individuo. La etiqueta o prospecto comprenderán adicionalmente instrucciones para administrar la composición al individuo. La etiqueta puede mostrar indicaciones para la reconstitución y/o uso. El recipiente que contiene la composición farmacéutica puede ser un vial

multiuso, que permite administraciones repetidas (p. ej., 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. Prospecto se refiere a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de tales productos terapéuticos. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender

5 adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

10 Los kits o artículo de fabricación pueden incluir múltiples dosis unitarias de la composición farmacéutica e instrucciones de uso, envasadas en cantidades suficientes para almacenamiento y uso en farmacias, por ejemplo, farmacias hospitalarias y farmacias que preparan fórmulas magistrales.

Los ejemplos que siguen están destinados a ser puramente ilustrativos de la invención y, por lo tanto, no deben considerarse como limitantes de la invención de ninguna manera. Los siguientes ejemplos y la descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

15 EJEMPLOS

No se pretende que los ejemplos descritos en el presente documento representen que los experimentos siguientes sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular

20 es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o cercana a la misma.

Ejemplo 1. Preparación de anticuerpos de dominio único

Para desarrollar anticuerpos de dominio único con alta afinidad de unión a antígenos específicos, se inmunizaron llamas y se construyó una biblioteca de presentación en fagos para identificar los VH_H principales. Se seleccionaron clones distintos al azar y se clasificaron según la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada, una región que puede desempeñar un papel principal en la unión al antígeno.

Para obtener los anticuerpos de dominio único, se inmunizaron llamas regularmente con inmunógenos respectivos, que pueden incluir proteína BCMA humana recombinante que tiene una etiqueta Fc C-terminal (ACRO Biosystems, Núm. de Cat.: BC7-H5254), proteína CD38 humana recombinante que tiene una etiqueta His C-terminal (ACRO Biosystems, Núm. de Cat.: CD8-H5224), proteína CD19 humana recombinante que tiene una etiqueta Fc C-terminal (ACRO Biosystems, Núm. de Cat.: CD9-H5229) y proteína CD20 humana recombinante que tiene una etiqueta Fc C-terminal (ACRO Biosystems, Núm. de Cat.: CD0-H526a).

35 Se describe a continuación un procedimiento de generación de anticuerpos de dominio único anti-BCMA como un ejemplo para generar anticuerpos de dominio único contra diversos antígenos. La generación de anticuerpos de dominio único anti-CD38 humano, anti-CD19 humano y anti-CD20 se realizó con procedimientos similares a los descritos a continuación. Se han descrito otros protocolos para preparar anticuerpos de dominio único. Véase, por ejemplo, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 2014; 9(3): 674.

1. Inmunización animal y ensayo de respuesta inmunitaria

1.1 Inmunización animal

40 Cada inmunógeno que comprendía una proteína antigénica recombinante se mezcló con adyuvante o PBS y se inyectó a una llama. Los animales fueron inmunizados por el comercializador del servicio (Cedarline) siete veces, típicamente con 200 µg de inmunógeno y CFA (Adyuvante Completo de Freund) cada vez a intervalos de aproximadamente 1 semana a 2 semanas. Se recogieron muestras de sangre periférica en la etapa previa a la inmunización y después de la 5^a y 7^a inmunización. Despues de múltiples rondas de inmunización, se evaluaron las reacciones inmunitarias de

45 las llamas contra el antígeno diana para confirmar el título de anticuerpos de dominio único específicos de antígeno. Los linfocitos se aislaron por centrifugación en gradiente a partir de aproximadamente 100 ml de sangre periférica. Las células se complementaron con RNALATER™ y se almacenaron a -80°C. Los sueros se obtuvieron mediante centrifugación de muestras de sangre anticoagulada y se almacenaron a -80°C.

1.2 Fraccionamiento de IgG

50 El fraccionamiento de la subclase IgG se llevó a cabo según el Procedimiento de Operación Convencional de GenScript. Las subclases de IgG se fraccionaron a partir del suero de sangrado terminal utilizando resinas de Proteína G y Proteína A. La muestra de suero de 1 ml se cargó en una columna HP de proteína G HITRAP® de 1 ml, y la columna se lavó con 10 ml de tampón fosfato (20 mM, pH 7,0). La fracción de IgG3 (PM 100.000 Da) se eluyó con NaCl 0,15 M, ácido acético 0,58% (pH 3,5), y el eluato se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 9,0) a pH 7,4. Posteriormente, la fracción de IgG1 (PM 170.000 Da) se eluyó con glicina-HCl 0,1 M (pH 2,7), y el eluato se neutralizó con Tris-HCl 1

5 M (pH 8,5) a pH 7,4. El flujo continuo de la columna HP de proteína G HITRAP® se cargó después en una columna HP de proteína A HITRAP® de 1 ml®, y la columna se lavó con 20 ml de tampón fosfato (20 mM, pH 7,0). La fracción de IgG2 (PM 100.000 Da) se eluyó con NaCl 0,15 M, ácido acético al 0,58% (pH 4,5), y el eluato se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 9,0) a pH 7,4. Las concentraciones de los anticuerpos IgG1, IgG2 e IgG3 purificados se determinaron mediante DO280, y la pureza de cada uno se evaluó mediante análisis de SDS-PAGE tanto reductor como no reductor.

1.3 Ensayo de la respuesta inmunitaria

10 La respuesta inmunitaria de las llamas se evaluó mediante ELISA, en donde las muestras de suero y las IgG purificadas se sometieron a ensayo para determinar la unión a inmunógenos inmovilizados. Se evaluaron los sueros recogidos antes de la inmunización, después de la 5^a inmunización y en el sangrado terminal. El antígeno (es decir, 15 proteína antígenica humana recombinante) se diluyó en tampón de recubrimiento a 4 µg/ml. La placa de microtitulación se recubrió con antígeno diluido a 4°C durante la noche. La placa se lavó después 3 veces con tampón de lavado seguido de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lavó posteriormente 4 veces con tampón de lavado. Se añadió una serie de sueros diluidos o IgG a la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La placa se lavó después 4 veces con tampón de lavado. Se añadió anticuerpo secundario anti-IgG de llama conjugado con HRP a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añadió el sustrato TMB a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos antes de parar con HCl 1 M. Para cuantificar la unión, se midió la absorbancia a 450 nm para cada pocillo utilizando un espectrómetro MK3.

2. Construcción de la biblioteca de expresión en fagos de V_HH

2.1 Extracción de ARN

20 Se extrajo el ARN total de los linfocitos aislados (de 1.1.1) utilizando Reactivo TRIZOL® según el protocolo del fabricante. La cantidad y calidad del ARN total se evaluaron mediante electroforesis en gel y se cuantificaron midiendo la absorbancia a DO260/280.

2.2 RT-PCR y Amplificación de V_HH

25 El ARN total se sometió a transcripción inversa a ADNc con un cebador oligo(dT)₂₀ utilizando un Kit de Síntesis de ADNc de 1^a Hebra PRIMESCRIP™ según el protocolo del fabricante. Se diseñaron seis cebadores degenerados específicos directos y dos inversos para amplificar los fragmentos V_HH, en los que se había introducido dos sitios de restricción BgII. Los fragmentos V_HH se amplificaron según el Procedimiento de Operación Convencional (SOP) de GenScript como se describe a continuación.

30 Las regiones variables de las inmunoglobulinas de cadena pesada (es decir, V_HH) se amplificaron utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dos etapas. En la primera PCR, se mezclaron 100 ng de molde de ADNc con los cebadores CALL001 (SEQ ID NO: 229) y CALL002 (SEQ ID NO: 230). Los productos de ADN de la primera reacción de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Después de la purificación en gel, los productos de ADN de la primera PCR se utilizaron como moldes en la segunda PCR. La segunda PCR se realizó con los cebadores BACK-1 (SEQ ID NO: 231), BACK-2 (SEQ ID NO: 232) y PMCF (SEQ ID NO: 233). Los segundos 35 productos de PCR amplificados que contenían los fragmentos de PCR de V_HH se purificaron en gel y se dirigieron con enzimas, y después se insertaron en plásmidos fagémidos. Los plásmidos recombinantes con los fragmentos del gen V_HH se electrotransfirieron a células *E. coli* para generar la biblioteca inmunitaria de V_HH de presentación en fagos.

40 El procedimiento de la reacción de PCR tiene una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 7 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; y seguido de una etapa de extensión final a 72°C durante 7 min.

2.3 Construcción de bibliotecas de fagos

45 Los productos de PCR V_HH se obtuvieron mediante amplificación utilizando diferentes pares de cebadores. Los productos de PCR se dirigieron después con BgII y se purificaron en gel. Los fragmentos purificados en gel se insertaron en el vector fagémido interno de GenScript. Se construyó una biblioteca piloto para optimizar las condiciones de ligación y transformación. Se emplearon las condiciones optimizadas de ligación y transformación para desarrollar la biblioteca de fagémidos. Una pequeña porción de las células transformadas se diluyó y se sembró en placas 2xYT complementadas con 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias se contaron para calcular el tamaño de la biblioteca. Los 50 clones positivos se seleccionaron aleatoriamente y se secuenciaron para evaluar la calidad de la biblioteca. El resto de las células transformadas se sembraron en placas YT complementadas con 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa. Se rascaron los céspedes de colonias de las placas. Se utilizó una pequeña alícuota de las células para el aislamiento del plásmido de la biblioteca. El resto se complementó con glicerol y se almacenó a -80°C como provisión de partida.

3. Inmunopurificación por presentación en fagos

3.1 Bioinmunopurificación

La biblioteca de fagos de $V_{H}H$ construida se sometió a inmunopurificación contra proteína BCMA humana recombinante y células CHO que expresaban BCMA humana (es decir, células CHO-BCMA, preparadas internamente por Legend Biotec) respectivamente utilizando un procedimiento convencional desarrollado por GenScript. La provisión de partida de la biblioteca se cultivó hasta la fase logarítmica, y después la biblioteca se rescató con fago auxiliar M13KO7 y se amplificó durante la noche a 25°C en un agitador. El fago se hizo precipitar después con PEG/NaCl, se resuspendió en PBS y se almacenó a -80°C. Para la inmunopurificación en fase sólida, los pocillos de microplaca se recubrieron con proteína BCMA humana recombinante en PBS a 4°C durante la noche. Para la inmunopurificación en fase líquida, las células CHO-BCMA se bloquearon con tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Durante la etapa de recubrimiento o bloqueo, las partículas de fago se preincubaron con el tampón de bloqueo y la proteína de control Fc en los pocillos de la microplaca. Después de la preincubación, se añadieron partículas de fago a los pocillos recubiertos con proteínas BCMA o solución de CHO-BCMA, respectivamente, y se incubaron durante 1 hora. Después de la incubación, los fagos no unidos y los unidos no específicamente se lavaron enjuagando los pocillos o las células CHO-BCMA con PBST seis veces complementando con dos lavados adicionales con PBS. Las partículas de fago unidas se eluyeron con trietilamina (TEA) 100 mM, y el eluado se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 7,4). La mitad del eluado se utilizó después para infectar células de *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial ($DO_{600} = 0,4\sim0,6$) para la titulación de salida.

3.2 ELISA de fagos

Se realizó un ELISA de fagos para identificar clones específicos para los antígenos diana. Los clones de fagos de salida individuales se cultivaron en una placa de 96 pocillos profundos y se rescataron con el fago auxiliar M13KO7 durante la noche. Para identificar los clones que se unían a proteínas antigenicas, se recubrieron placas de microtitulación de ELISA de 96 pocillos con proteína BCMA humana recombinante y proteína de control de Fc respectivamente en tampón de recubrimiento durante la noche a 4°C, y después se bloquearon las placas con tampón de bloqueo. Después del bloqueo, se añadieron aproximadamente 50 μ l por pocillo de sobrenadante de fago del cultivo celular durante la noche a las placas durante 1,5 horas de incubación a 4°C. Las placas se lavaron cuatro veces, y el anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con HRP se añadió a las placas durante 45 minutos de incubación a 4°C. Las placas se lavaron de nuevo cinco veces y se añadió solución de sustrato a los pocillos para su revelado. Se midió la absorción a 450 nm para cada pocillo.

Para identificar los clones que se unían a células CHO-BCMA, las células CHO-BCMA se bloquearon con tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del bloqueo, se añadieron aproximadamente 20 μ l por pocillo de sobrenadante de fago del cultivo celular durante la noche a las disoluciones celulares durante 1 hora de incubación a temperatura ambiente. Después de lavar las células 4 veces, se añadió el anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con HRP durante 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Las células se lavaron cinco veces y después se añadió solución de sustrato para el revelado. La absorción se midió a 450 nm.

Después de la inmunopurificación, se seleccionaron aleatoriamente clones individuales positivos para ELISA de fagos y se preparó ADN a partir del fago de salida utilizando kits de extracción de plásmidos. Se secuenciaron los insertos en los plásmidos. Se obtuvieron una o más secuencias de $V_{H}H$ para cada antígeno diana, véase, por ejemplo, la Tabla 2.

40 Ejemplo 2. Preparación de receptores de antígeno químéricos de $V_{H}H$ monoespecíficos

Una secuencia de la cadena principal de CAR que codificaba un polipéptido de la cadena principal de CAR que comprendía del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un dominio bisagra de CD8a, un dominio transmembrana de CD28, un dominio citoplasmático de CD28, un dominio citoplasmático de CD137 y un dominio citoplasmático de CD3 ζ se sintetizó químicamente y se clonó en un vector lentiviral previamente modificado aguas abajo y se conectó operablemente a un promotor hEF1 α constitutivo. El vector de la cadena principal de CAR resultante se denominó "PLLV-hEF1 α -8281373". Los sitios de clonación múltiple (MCS) en el vector permitieron la inserción de una secuencia de ácido nucleico que comprendía una secuencia de Kozak (SEQ ID NO: 126) conectada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codificaba un péptido señal CD8a fusionado al extremo N-terminal de un fragmento $V_{H}H$ en el vector PLLV-hEF1 α -8281373, aguas arriba y conectado operablemente a la secuencia de la cadena principal de CAR.

Para construir un CAR monoespecífico que tuviera un único dominio $V_{H}H$ utilizando la cadena principal de PLLV-hEF1 α -8281373, la secuencia de ácido nucleico que codificaba el dominio $V_{H}H$ se conectó operablemente al 3' de la secuencia de ácido nucleico que codificaba el péptido señal CD8a. La secuencia de ácido nucleico de fusión se sintetizó químicamente y se clonó en la cadena principal de CAR de PLLV-hEF1 α -8281373 a través de los sitios de restricción EcoRI (SEQ ID NO: 234: 5'-GAATTC-3') y Spel (SEQ ID NO: 235: 5'-ACTAGT-3') mediante mecanismos de clonación molecular conocidos en la técnica. La Tabla 4 enumera los vectores que se construyeron para expresar los CAR monoespecíficos monovalentes ilustrativos anti-BCMA y anti-CD38.

Para facilitar la inserción adicional de secuencias adicionales, tales como un nucleótido que codifica una segunda $V_{H}H$, cuando se diseña una construcción de CAR monoespecífica (por ejemplo, anti-BCMA o anti-CD38), se incluyeron sitios de restricción que incluían Hpal (SEQ ID NO: 236: 5'-GTTAAC-3'), MluI (SEQ ID NO: 237: 5'-ACGCGT-3'), Nsil (SEQ ID NO: 238: 5'-ATGCAT-3') entre la secuencia de ácido nucleico del péptido señal CD8α y la secuencia de ácido nucleico de $V_{H}H$.

La mezcla de plásmido de empaquetamiento de lentivirus que incluía pCMV-ΔR-8.74 y pMD2.G (Addgene Núm. 12259) se mezcló previamente con los vectores PLLV-hEF1α-8281373 que tenían los fragmentos $V_{H}H$ (Tabla 4) a una razón pre-optimizada con polieterimida (PEI), a continuación, se mezclaron adecuadamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla de transfección se añadió después gota a gota a las células HEK293 y se mezcló suavemente. Después, las células se incubaron durante la noche en una incubadora de células a 37°C y 5% de CO₂. Los sobrenadantes se recogieron después de la centrifugación a 4°C, 500 g durante 10 minutos.

Los sobrenadantes que contenían virus se filtraron a través de un filtro PES de 0,45 μm, seguido de ultracentrifugación para la concentración de lentivirus. Después de la ultracentrifugación, los sobrenadantes se desecharon cuidadosamente y los sedimentos virales se aclararon cuidadosamente con DPBS enfriada previamente. El virus se dividió en alícuotas adecuadamente, después se almacenó a -80°C inmediatamente. El título de virus se determinó mediante p24 basándose en el kit HTRF desarrollado por GenScript.

Preparación de PBMC

Se recogieron leucocitos de donantes sanos mediante aféresis, y se ajustó la concentración celular a 5×10^6 células/ml en medio R10. Los leucocitos se mezclaron después con solución de NaCl al 0,9% a una razón 1:1 (v/v). Se añadieron 20 3 ml de medio linfoprep a un tubo de centrífuga de 15 ml, y se colocaron lentamente en capas 6 ml de mezcla de linfocitos diluida sobre el medio linfoprep. La mezcla de linfocitos se centrifugó a 800 g durante 30 minutos sin freno a 20°C. Después, la capa leucocitaria de linfocitos se recogió con una pipeta de 200 μl. La fracción recolectada se diluyó al menos 6 veces con NaCl al 0,9% o R10 para reducir la densidad de la solución. La fracción recolectada se centrifugó después a 250 g durante 10 minutos a 20°C. El sobrenadante se aspiró completamente, y se añadieron 10 ml de R10 al sedimento celular para resuspender el sedimento celular. La mezcla se centrifugó adicionalmente a 250 g durante 10 minutos a 20°C. El sobrenadante se aspiró de nuevo. Se añadieron 2 ml de R10 precalentado a 37°C con 100 UI/ml de IL-2 al sedimento celular, y el sedimento celular se resuspendió suavemente. El número de células se determinó después de la tinción con azul de tripano, y esta muestra de PBMC estaba lista para experimentos posteriores.

Purificación de células T

30 Las células T humanas se purificaron a partir de PBMC utilizando el kit de aislamiento de células Pan T Miltenyi (Núm. de Cat. 130-096-535), siguiendo el protocolo del fabricante como se describe a continuación. El número de células se determinó en primer lugar y la suspensión celular se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se aspiró completamente a continuación, y los sedimentos celulares se resuspendieron en 40 μl de tampón por 10^7 células totales. Se añadieron 10 μl de Cóctel de Biotina-Anticuerpo de Células Pan T por 10^7 células totales, se mezclaron completamente y se incubaron durante aproximadamente 5 minutos en el refrigerador (2~8°C). Después se añadieron 30 μl de tampón por 10^7 células. Se añadieron 20 μl de Cóctel de MicroCuentas de Células Pan T por 10^7 células. La mezcla de suspensión celular se mezcló bien y se incubó durante 10 minutos adicionales en el refrigerador (2~8°C). Se requiere un mínimo de 500 μl para la separación magnética. Para la separación magnética, se colocó una columna LS en el campo magnético de un separador MACS adecuado. La columna se preparó enjuagando con 3 ml de tampón.

35 40 45

La suspensión celular se aplicó después sobre la columna, y se recogió el flujo continuo que contenía las células no marcadas, lo que representó las fracciones enriquecidas de células T. Se recogieron células T adicionales lavando la columna con 3 ml de tampón y recogiendo las células no marcadas que pasan a través de la misma. Estas células no marcadas representaron de nuevo las células T enriquecidas, y se combinaron con el flujo continuo de la etapa anterior. Las células T enriquecidas reunidas se centrifugaron después y se resuspendieron en R10 + 100 UI/ml de IL-2.

Las células T preparadas se preactivaron posteriormente durante 48-96 horas con el kit de activación/expansión de células T humanas (Miltenyi Núm. 130-091-441) según el protocolo del fabricante en el que se añadieron partículas MACSibead anti-CD3/CD28 a una razón de cuenta a célula de 1:2.

50 Las células T pre-activadas se transdijeron con provisión de partida de lentivirus en presencia de 7 μg/ml de polibreño con centrifugación a 1200 g, 32°C durante 1,5 h. Las células transducidas se transfirieron después a la incubadora de cultivo celular para la expresión transgénica en condiciones adecuadas.

55 El día 3 o el día 7 después de la transducción, se recogieron las células T transducidas y se incubaron conjuntamente con células tumorales a una razón de célula efectora (CAR-T) a diana de 20:1 durante 20 horas. Las células diana eran células o bien de la línea celular de mieloma múltiple humano RPMI8226.Luc o bien de la línea celular de glioblastoma humano U87MG.Luc, estando ambas líneas celulares modificadas mediante ingeniería genética en el laboratorio para expresar luciferasa de luciérnaga. Para someter a ensayo la citotoxicidad de CAR-T en células tumorales, se prepararon reactivos de ensayo de luciferasa luminiscente One-glo (Promega Núm. E6110) según el protocolo del fabricante y se añadieron a las células cultivadas conjuntamente para detectar la actividad de luciferasa

restante en el pocillo. Puesto que la luciferasa se expresa sólo en células RPMI8226.Luc o U87MG.Luc, la actividad de luciferasa restante en el pocillo se correlaciona directamente con el número de células diana viables en el pocillo. La actividad luciferasa máxima se obtuvo añadiendo medio de cultivo a células diana en ausencia de células efectoras. La actividad luciferasa mínima se determinó añadiendo Triton X-100 a una concentración final del 1% en el momento en que se iniciaron los ensayos de citotoxicidad. La citotoxicidad específica se calculó mediante la fórmula: % de Citotoxicidad Específica = 100% * (1-(URLmuestra-URLmin)/(URLmax-URLmin)).

Los clones de CAR monoespecíficos dirigidos a BCMA (CD269) se codificaron comenzando con los dígitos 269 mientras que los clones de CAR monoespecíficos dirigidos a CD38 se codificaron de manera similar comenzando con los dígitos 38. Como se muestra en la FIG. 2A, los clones seleccionados exhibieron diferentes niveles de citotoxicidad sobre células de la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226.Luc, mostrando más de 60% de CAR-T basados en V_HH monoespecíficos > 50% de citotoxicidad contra células RPMI8226.Luc. Los clones 269A37346, 269A37348, 269A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717, y 38A37719 basados en CAR-T se seleccionaron para pruebas adicionales. En particular, los clones 269A37346, 269A37348, 267A37353, 269A37355, 38A37326, 38A37331, 38A37717 basados en CAR-T exhibieron una citotoxicidad potente sobre células RPMI8226.Luc de la línea celular de mieloma múltiple con más del 20%-30% de aumento en la destrucción de células RPMI8226.Luc por tratamiento con CAR-T en comparación con células T de control no transducidas (UnT). Sin embargo, tal aumento de citotoxicidad no se produjo en las células de la línea celular de glioblastoma humano U87MG.Luc (véase la FIG. 2B). No se detectaron efectos de citotoxicidad significativos sobre U87MG.Luc por estas células CAR-T basadas en V_HH monoespecíficos en comparación con controles UnT. La observación anterior indicó que algunos de estos clones podrían ser específicos de diana y potentes sobre células positivas para BCMA o CD38.

Ejemplo 3. Preparación de receptores de antígeno químéricos biespecíficos o multivalentes ilustrativos

Los clones potencialmente potentes como se describe en el Ejemplo 2 también podrían ser candidatos favorables para generar CAR basados en V_HH biespecíficos o multivalentes. Se seleccionaron dos clones de V_HH representativos (clon de V_HH anti-BCMA 269A37346 y clon de V_HH anti-CD38 38A37717) para construir diversas construcciones de CAR ilustrativos.

Los CAR basados en V_HH de BCMA x CD38 se pueden generar combinando de BCMA y V_HH específico de CD38 a través de un conector peptídico adecuado (p. ej., polímero Gly-Ser) seguido de un vector de cadena principal del dominio de señalización de CAR. En la Tabla 6 se enumeran construcciones de CAR biespecíficas de BCMA x CD38 ilustrativos (GSI5001 a GSI5010). En primer lugar, la secuencia de aminoácidos de V_HH anti-BCMA y de V_HH anti-CD38 se conectaron entre sí a través de un conector Gly-Ser que podría ser de diferentes longitudes. A continuación, la secuencia de aminoácidos conectada se colocó después de la secuencia del péptido señal CD8α. Esta secuencia combinada que incluía Kozak-péptido señal CD8α-V_HH biespecífico se sintetizó directamente y se clonó en una cadena principal de CAR PLLV-hEF1α-81373 a través de sitios de restricción EcoRI y Spel, mediante protocolos de clonación molecular regulares conocidos en la técnica. La secuencia de la cadena principal de CAR codificaba un polipéptido de la cadena principal de CAR que comprendía del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un dominio bisagra de CD8α, un dominio transmembrana de CD8α, un dominio citoplasmático de CD137 y un dominio citoplasmático de CD3ζ se sintetizó químicamente y se clonó en un vector lentiviral modificado previamente aguas abajo y se conectó operablemente a un promotor hEF1α constitutivo. El vector de la cadena principal de CAR resultante se denominó "PLLV-hEF1α-81373".

Adicionalmente, se construyó un vector de coexpresión ilustrativo que codificaba CAR de BCMA y CAR de CD38 combinando CAR basado en V_HV específico de BCMA y CAR basado en V_HH específico de CD38 en un solo vector de CAR a través de un conector basado en empalme adecuado (T2A, P2A o F2A). Por ejemplo, la construcción GSI5013 tiene una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 239. La secuencia de ácido nucleico en GSI5013 codifica de 5' a 3': péptido señal CD8α, V_HH 38A37717, dominio bisagra de CD8α, dominio transmembrana de CD8α, dominio coestimulador de CD137, dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ, T2A, péptido señal CD8α, V_HH 269A37346, dominio bisagra de CD8α, dominio transmembrana de CD8α, dominio coestimulador de CD137 y dominio de señalización citoplasmático de CD3ζ.

Los CAR de V_HH multivalentes se pueden construir introduciendo una secuenciación de ácidos nucleicos que codifica múltiples copias de un único V_HH fusionadas entre sí por conectores peptídicos en un vector de la cadena principal del dominio señal de CAR. En la Tabla 5 se enumeran construcciones de CAR multivalentes monovalentes ilustrativas (GSI5014, GSI5015, GSI5016, GSI5017). Estas construcciones se prepararon conectando 2-3 copias de V_HH por conector de Glicina-serina seguido de la síntesis directa de esta secuencia conectada combinada con la secuencia de ácido nucleico Kozak-péptido señal CD8α, y clonación en la cadena principal de CAR PLLV-hEF1α-81373 a través de sitios de restricción EcoRI y Spel. Como control, también se clonó en la misma cadena principal de CAR PLLV-hEF1α-81373 una única copia de V_HH mediante métodos idénticos (GSI5011 y GSI5012, enumerados en la Tabla 4).

Los vectores lentivirales que portaban los genes CAR de GSI5001 a GSI5017 se empaquetaron y titularon con los protocolos descritos en el Ejemplo 2. Utilizando los protocolos descritos en el Ejemplo 2, se prepararon PBMC humanas a partir de sangre periférica de voluntarios para el aislamiento adicional de células T humanas primarias utilizando kits de aislamiento de células PanT humanas Miltenyi. Las células T purificadas se preeactivaron y expandieron utilizando microcuentas anti-CD3/CD28 de Miltenyi como se describe en el Ejemplo 2. Las células T pre-

activadas se transdujeron después con provisión de partida de lentivirus en presencia de 7 µg/ml de polibreno por centrifugación a 1200 g, 32°C durante 1,5 h. Las células transducidas se transfirieron después a la incubadora de cultivo celular para la expresión transgénica en condiciones adecuadas.

5 El día 3 después de la transducción, se recogieron las células T transducidas y se incubaron conjuntamente con células tumorales a una razón de célula efectora (CAR-T) a diana de 20:1 durante 20 horas. Para someter a ensayo la citotoxicidad de CAR-T sobre células tumorales, se añadieron reactivos de ensayo de luciferasa luminiscentes One-glo (Promega Núm. E6110) a las células cultivadas conjuntamente y se midió la citotoxicidad específica para cada CAR-T como se describe en el Ejemplo 2.

10 El número de copias de genes de CAR integrados para cada grupo se determinó mediante un ensayo de PCR semicuantitativa (q-PCR). En resumen, se preparó ADN genómico de cada grupo de CAR-T con el kit de células Gentra Puregene (Qiagen). La concentración de ADN genómico se determinó mediante Nanodrop, y se procesó una muestra de ADN genómico de 10 ng para un ensayo de q-PCR normalizado con mezcla Maestra de PCR en Tiempo Real SYBR Green plus (Toyobo) en un aparato de q-PCR ABI Núm. 7300 utilizando cebadores específicos de CAR (cebador directo 137P2F (SEQ ID NO: 252): 5'-GTCCTTCTCCTGTCACTGGTTAT-3'; y cebador inverso 137P2R (SEQ ID NO: 253): 5'-TCTTCTTCTGGAAATCGGCA-3'). El número de copias relativo de cada gen CAR integrado se calculó basándose en una curva patrón establecida utilizando plásmidos que contenían secuencias diana.

15 Como se muestra en la Tabla 7 a continuación, se determinaron los números de copias para cada preparación de CAR-T y los datos sugirieron una alta integración del gen diana en el genoma de las células T.

TABLA 7. Números de copias de integración genómica.

Células CAR-T con construcciones	Copias/ng de ADNg
GSI5001	18257060
GSI5002	15105810
GSI5003	17307510
GSI5004	2735165
GSI5005	No procesado
GSI5006	6692277
GSI5007	6929693
GSI5008	15549250
GSI5009	10602720
GSI5010	7353348
GSI5011	3089537
GSI5012	650551.3
GSS005	1070972
GSI005	321521
UnT	72.77
agua	117

20 Como se ilustra en las FIG. 3A-3B, CAR de V_HH monoespecífico contra BCMA (GSI5011) y el CAR de V_HH monoespecífico contra CD38 (GSI5012) mostraron una potente citotoxicidad sobre la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226.Luc. Con el CAR GSI5011, se lisaron $42,98 \pm 2,86\%$ de las células RPMI8226.Luc, y con GSI5012, se lisaron $61,25 \pm 1,92\%$ de las células RPMI8226.Luc, en comparación con la lisis no específica por células T de control no transducidas (UnT, $9,25 \pm 1,11\%$).

25 Los CAR biespecíficos GSI5001-GSI5010 provocaron una potente lisis específica de la línea celular de mieloma múltiple RPMI8226.Luc en comparación con las células T de control no transducidas (UnT). Como se muestra en las FIG. 3A y 3B, el porcentaje específico de lisis de células RPMI8226.Luc fue de $98,91 \pm 0,17\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5001, $97,10 \pm 0,26\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5002, $93,85 \pm 0,69\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5003, $82,81 \pm 2,40\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5004, $98,95 \pm 0,66\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5005, $93,91 \pm 1,25\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5006, $96,49 \pm 1,05\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5007, $94,41 \pm 0,75\%$ para células CAR-T que expresaban GSI5008, $90,72 \pm 0,62\%$ para células T CAR que expresaban GSI5009, y $85,05 \pm 2,69\%$ para células T CAR que expresaban GSI5010, en

comparación con la lisis no específica por células T de control no transducidas (UnT, $9,25 \pm 1,11\%$). Estos resultados también implicaban que el conector de Gly-Ser más corto parecía mostrar un rendimiento de citotoxicidad ligeramente mejor sobre células tumorales diana. Podrían realizarse estudios adicionales en condiciones de ensayo subóptimas para estudiar tales efectos. Por otra parte, el orden de V_HH anti-BCMA y V_HH anti-CD38 en el vector no mostró influencia significativa sobre el rendimiento de citotoxicidad final sobre células RPMI8226.Luc. También se prepararon dos células CAR-T basadas en scFv en el ensayo, en el que GSS005 era un CAR basado en scFv anti-BCMA mientras que GSI005 era un CAR basado en scFv anti-CD38. Tanto GSS005 como GSI005 mostraron también una potente lisis específica contra células RPMI8226.Luc ($57,94 \pm 1,91\%$ para GSS005, $61,25 \pm 1,92\%$ para GSI005).

Se prepararon células T modificadas mediante ingeniería genética con CAR monovalente específico de BCMA (GSI5011), CAR bivalente específico de BCMA (GSI5012) o células T modificadas mediante ingeniería genética con CAR trivalente específico de BCMA (GSI5013), y células T modificadas mediante ingeniería genética con CAR monovalente específico de CD38 (GSI5012), CAR bivalente específico de CD38 (GSI5016) o CAR trivalente específico de CD38 (GSI5017) y se realizaron ensayos de citotoxicidad en células RPMI8226.Luc como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la FIG. 4, el porcentaje específico de lisis de células RPMI8226.Luc fue $63,25 \pm 2,64\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5011, $61,04 \pm 2,75\%$ por células CAR-T que expresan GSI5014, y $59,57 \pm 2,64\%$ por células CAR-T que expresan GSI5015, en comparación con $0,05\% \pm 2,33\%$ por células T de control no transducidas (UnT). Asimismo, como se representa en la FIG. 4, la lisis específica de células RPMI8226.Luc por CAR-T de V_HH anti-CD38 fue $95,79 \pm 0,62\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5012, $94,16 \pm 0,31\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5016, y $97,61 \pm 0,77\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5015, en comparación con $57,92\% \pm 2,88\%$ por células T de control no transducidas (UnT). Los datos sugirieron que estos CAR con diferentes modalidades de unión a antígeno tenían una potente actividad antitumoral contra células positivas para BCMA.

Ejemplo de Referencia 4. Preparación, Ensayos *in vitro* e *in vivo* de un CAR para CD19xCD20 ilustrativo

Se obtuvieron sdAb anti-CD19 y sdAb anti-CD20 ilustrativos mediante procedimientos similares a los del Ejemplo 1. Estos anticuerpos de dominio único se enumeran en la Tabla 2. El CAR de CD19 monoespecífico basado en el V_HH de CD19 y el CAR de CD20 monoespecífico basado en V_HH de CD20 se prepararon como se describe en el Ejemplo 2, y se enumeraron en la Tabla 4. Se construyó un CAR de CD19xCD20 biespecífico ilustrativo basado en el V_HH de CD19 y V_HH de CD20 como se describe en el Ejemplo 3, y se enumera en la Tabla 6. El vector de la cadena principal de CAR utilizado para construir el CAR de CD19, el CAR de CD20 y el CAR de CD19xCD20 ilustrativos codifica del extremo N-terminal al extremo C-terminal: un péptido señal CD8a, dominio bisagra de CD8a, un dominio transmembrana de CD28, un dominio citoplasmático de CD28 y un dominio citoplasmático de CD3ζ. La FIG. 5 muestra las construcciones del CAR de CD19, el CAR de CD20 y el CAR de CD19xCD20 biespecífico. Se prepararon células CAR-T modificadas mediante ingeniería genética que expresaban el CAR CD19, el CAR CD20 o el CAR CD19xCD20 biespecífico como se describe en el Ejemplo 2.

La citotoxicidad de las células CAR-T se determinó en un ensayo de cultivo conjunto de 4 horas. En los experimentos, las células CAR-T preparadas se recogieron por centrifugación, después se diluyeron a las concentraciones deseadas mediante DPBS con suero AB humano al 10%, y se cultivaron en placas de 96 pocillos. Las células tumorales Raji, que se sabe que muestran una fuerte expresión de CD19 y CD20, se marcaron con calceína-AM (BD Biosciences). Las células CAR-T marcadas y las células Raji se cultivaron a una razón de efector a diana de 10:1 a 37°C durante 4 h. Posteriormente, la citotoxicidad de las células CAR-T se detectó mediante FACS.

Como se muestra en el panel superior izquierdo de la FIG. 6, no hubo lisis significativa de células Raji por células T no transducidas. La citotoxicidad en células Raji fue de alrededor de 40% por células CAR-T de V_HH monoespecíficas para CD19 (39%, panel superior derecho) o CD20 (41%, panel inferior izquierdo). Cuando es los mismos V_HH de CD19 y V_HH de CD20 se fusionaron para servir como dominio de unión a antígeno extracelular en la misma construcción, es decir, en las células CAR-T biespecíficas para CD19xCD20, la citotoxicidad de las células tumorales Raji (75,24%) se potenciaron en comparación con las células CAR-T de V_HH para CD19 o las células CAR-T de V_HH para CD20 monoespecíficas (FIG. 6 panel inferior derecho).

Estudios de modelos tumorales de ratón

Se infundieron ratones NOG con 4×10^6 células Raji por ratón a través de inyección en la vena de la cola. Después de 10 días, los ratones se dividieron uniformemente en cuatro grupos al azar, donde a cada grupo se le inyectaron dosis equivalentes de células T no transducida, células CAR T para CD19, células CAR T para CD20 o células CAR T biespecíficas para CD19xCD20 respectivamente, y se observaron continuamente durante 5 semanas.

Como se muestra en la FIG. 7, los datos de supervivencia *in vivo* sugirieron que la tasa de supervivencia global para ratones tratados con CAR biespecíficos para CD19xCD20 era mayor que con células CAR T monoespecíficas para CD19 o CD20.

Ejemplo 5. Preparación de CAR bivalentes monoespécíficos ilustrativos que tienen dos dominios de unión a BCMA diferentes

También podrían utilizarse clones de V_{HH} potenciales como se describe en el Ejemplo 2 para generar CAR multivalentes monoespécíficos que tenían dos o más dominios de unión a diana diferentes en el dominio de unión a antígeno extracelular. Se seleccionaron dos clones representativos de sdAb anti-BCMA (clon 269A37353 y clon 269A37917) para construir diversas construcciones de CAR bivalentes monoespécíficos ilustrativos en el presente ejemplo.

Se pueden generar CAR bivalentes que se dirigen a BCMA (es decir, CAR para BCMA bivalentes) fusionando dos dominios V_{HH} específicos para BCMA diferentes a través de un conector peptídico adecuado (p. ej., polímero Gly-Ser), y posteriormente insertando la construcción de fusión en un vector de cadena principal del dominio señal de CAR. En la Tabla 5 se enumeran construcciones de CAR de BCMA bivalentes ilustrativas (GSI5021-GSI5026) que tienen dos dominios de unión a BCMA 269A37353 y 269A37917 diferentes. Se utilizaron conectores peptídicos de diversas longitudes en diferentes construcciones. Las construcciones GSI5021-GSI5023 codificaron cada una del extremo N-terminal al extremo C-terminal: péptido señal CD8 α , 269A37353, conector peptídico, 269A37917, bisagra de CD8 α , dominio transmembrana de CD8 α , dominio citoplasmático de CD137 y dominio citoplasmático de CD3 ζ humano. Las construcciones GSI5024-GSI5026 codificaron cada una del extremo N-terminal al extremo C-terminal: péptido señal CD8 α , 269A37917, conector peptídico, 269A37353, bisagra de CD8 α , dominio transmembrana de CD8 α , dominio citoplasmático de CD137 y dominio citoplasmático de CD3 ζ humano. Cada construcción se fusionó adicionalmente con una secuencia de Kozak en 5' para proporcionar la secuencia codificante completa. La secuencia codificante completa se sintetizó directamente y se clonó en una cadena principal de CAR PLLV-hEF1 α -81373 a través de sitios de restricción EcoRI y Spel utilizando protocolos de clonación molecular comunes conocidos en la técnica. Por el contrario, se construyeron CAR monoespécíficos monovalentes (GSI5019 y GSI5020, enumerados en la Tabla 4) que tenían la misma estructura principal del dominio señal de CAR utilizando métodos similares.

Los vectores lentivirales que portaban cada una de las construcciones de CAR GSI5019-GSI5026 se empaquetaron y titularon con protocolos como se describe en el Ejemplo 2. Utilizando los protocolos descritos en el Ejemplo 2, se prepararon PBMC humanas a partir de muestras de sangre periférica de voluntarios para el aislamiento adicional de células T humanas primarias utilizando kits de aislamiento de células PanT humanas Miltenyi. Las células T purificadas se preactivaron y expandieron utilizando microcuentas anti-CD3/CD28 de Miltenyi como se describe en el Ejemplo 2.

Las células T pre-activadas se transdijeron después con provisión de partida de lentivirus en presencia de 7 μ g/ml de polibreno por centrifugación a 1200 g, 32°C durante 1,5 h. Las células transducidas se transfirieron después a la incubadora de cultivo celular para la expresión transgénica en condiciones adecuadas.

El día 3 después de la transducción, se recogieron células T transducidas y se incubaron conjuntamente con células tumorales (células RPMI8226.Luc o células U87MG.Luc) a una razón de célula efectora (CAR-T) a diana de 20:1 durante 20 horas. Las células RPMI8226.Luc son células de mieloma múltiple que expresan luciferasa, y son positivas para BCMA. Las células U87MG.Luc son células de glioblastoma que expresan luciferasa, y son negativas para BCMA. Para someter a ensayo la citotoxicidad de los CAR-T sobre células tumorales, se añadieron reactivos de ensayo de luciferasa luminiscente One-glo (Promega Núm. E6110) a las células cultivadas conjuntamente y se midió la citotoxicidad específica para cada CAR-T como se describe en el Ejemplo 2.

Como se muestra en la FIG. 8A, el porcentaje específico de lisis de células RPMI8226.Luc fue $88,21 \pm 1,29\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5019, $93,84 \pm 1,13\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5020, $71,45 \pm 1,79\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5021, $99,80 \pm 0,45\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5022, $97,46 \pm 0,50\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5023, $81,29 \pm 1,27\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5024, $93,50 \pm 0,47\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5025, $87,83 \pm 0,23\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5026, respectivamente, en comparación con $13,49 \pm 1,75\%$ por células T de control no transducidas (UnT). Asimismo, como se representa en la FIG. 8B, el porcentaje específico de lisis de la línea celular negativa para BCMA U87MG.Luc fue de $2,84 \pm 7,41\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5019, $15,50 \pm 2,24\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5020, $6,74 \pm 3,37\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5021, $8,03 \pm 2,36\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5022, $9,00 \pm 1,88\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5023, $17,03 \pm 2,27\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5024, $16,81 \pm 1,98\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5025, $-11,55 \pm 5,43\%$ por células CAR-T que expresaban GSI5026, En comparación con $12,49 \pm 3,79\%$ por células T de control no transducidas (UnT). Los datos sugieren que los CAR multivalentes con diferentes modalidades de unión a antígeno tenían una potente actividad antitumoral contra células positivas para BCMA, pero no contra células negativas para BCMA.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un polipéptido que comprende:

5 (a) un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un primer anticuerpo de dominio único (sdAb) que se une específicamente a un primer antígeno y un segundo sdAb que se une específicamente a un segundo antígeno, en donde cada uno del primer y segundo sdAb es un V_HH;

(b) un dominio transmembrana; y

(c) un dominio de señalización intracelular;

10 en donde el primer sdAb es un sdAb anti-BCMA que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y

15 en donde el segundo sdAb es un sdAb anti-BCMA que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

2. El CAR de la reivindicación 1, en donde el primer sdAb está localizado en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del segundo sdAb.

3. El CAR de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer sdAb y/o el segundo sdAb son de camélido, quiméricos o humanizados.

4. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el primer sdAb y el segundo sdAb se fusionan directamente entre sí a través de un enlace peptídico.

20 5. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el primer sdAb y el segundo sdAb se fusionan entre sí a través de un conector peptídico.

6. El CAR de la reivindicación 5, en donde el conector peptídico no tiene más de 50 aminoácidos de longitud.

25 7. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD8α, CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 y PD1.

8. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular primario de una célula efectora inmunitaria.

9. El CAR de la reivindicación 8, en donde el dominio de señalización intracelular primario es el dominio de señalización intracelular primario de CD3ζ.

30 10. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador.

11. El CAR de la reivindicación 10, en donde el dominio de señalización coestimulador es el dominio de señalización coestimulador de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y sus combinaciones, preferiblemente CD137.

35 12. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende adicionalmente un dominio bisagra localizado entre el extremo C-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular y el extremo N-terminal del dominio transmembrana.

13. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende adicionalmente un péptido señal localizado en el extremo N-terminal del polipéptido.

40 14. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

15. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 14.

16. El vector de la reivindicación 15, en donde el vector es un vector lentiviral.

17. El vector de la reivindicación 16, en donde el vector lentiviral es un vector lentiviral autoinactivante.

45 18. Una célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética que comprende el CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, el ácido nucleico aislado de la reivindicación 14, o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17.

19. La célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería de la reivindicación 18, en donde la célula efectora inmunitaria es una célula T.
20. Una composición farmacéutica que comprende la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética de la reivindicación 18 o 19, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 5 21. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 20 para su uso en un método para tratar el cáncer en un individuo.
22. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 21, en donde la célula efectora inmunitaria modificada mediante ingeniería genética es autóloga.
- 10 23. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 21 o 22, en donde el cáncer es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda o leucemia linfocítica crónica.
24. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 23, en donde el cáncer es mieloma múltiple.

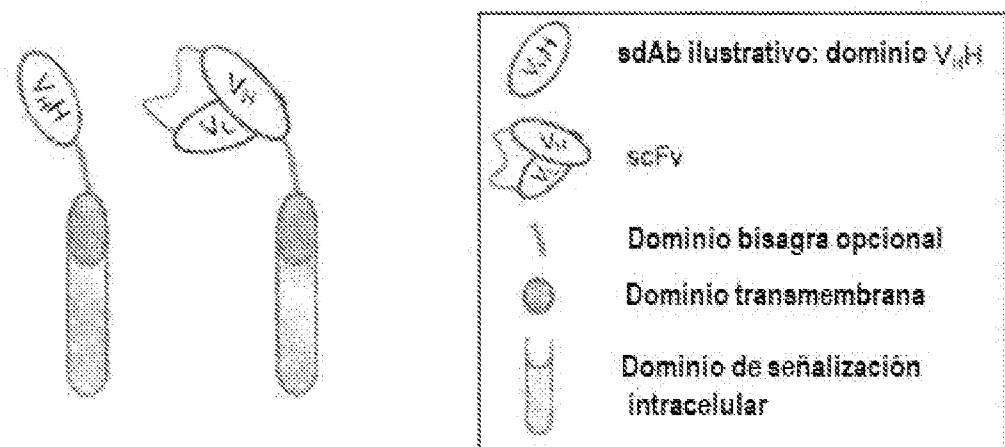


FIG. 1A

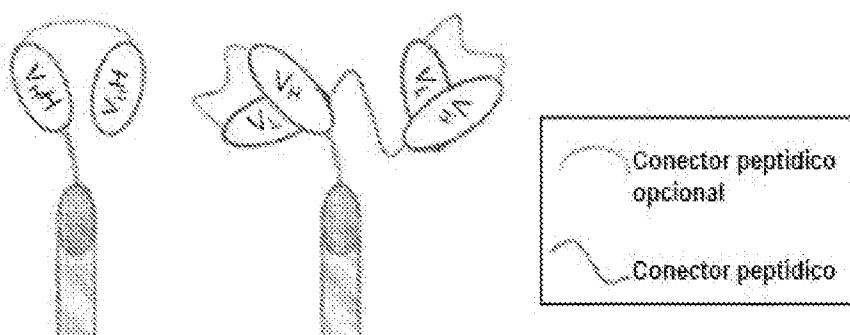


FIG. 1B

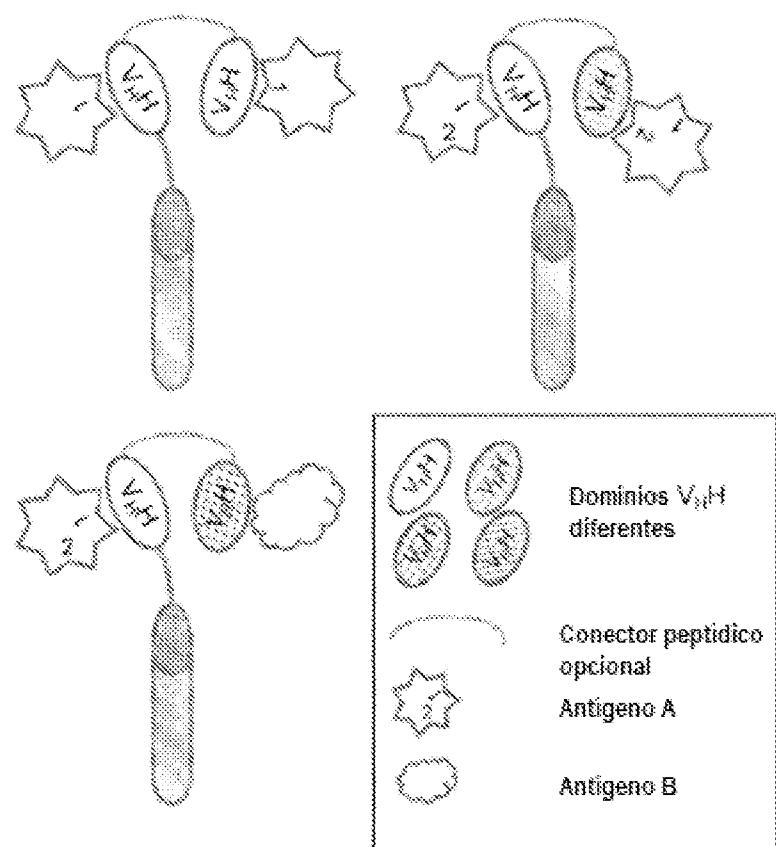


FIG. 1C

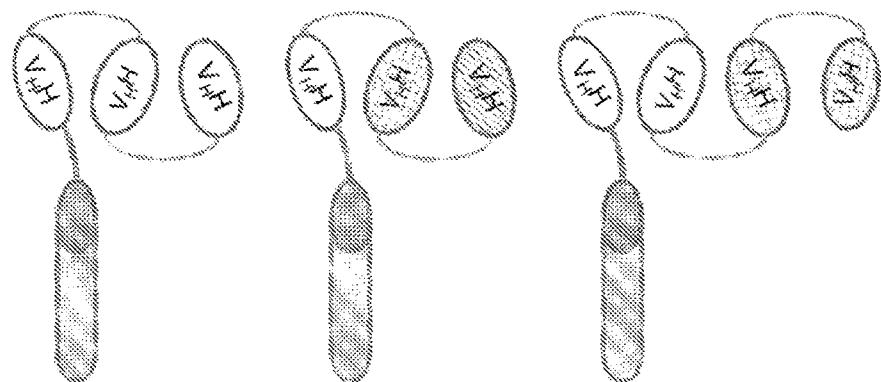


FIG. 1D

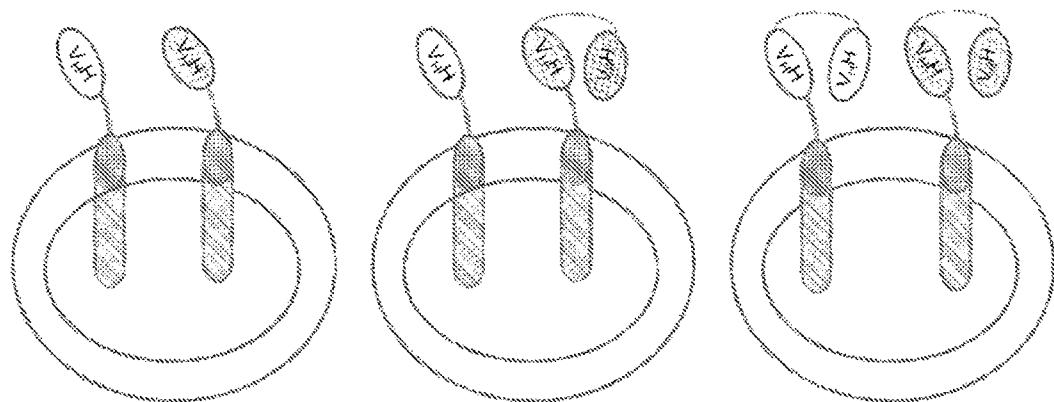


FIG. 1E

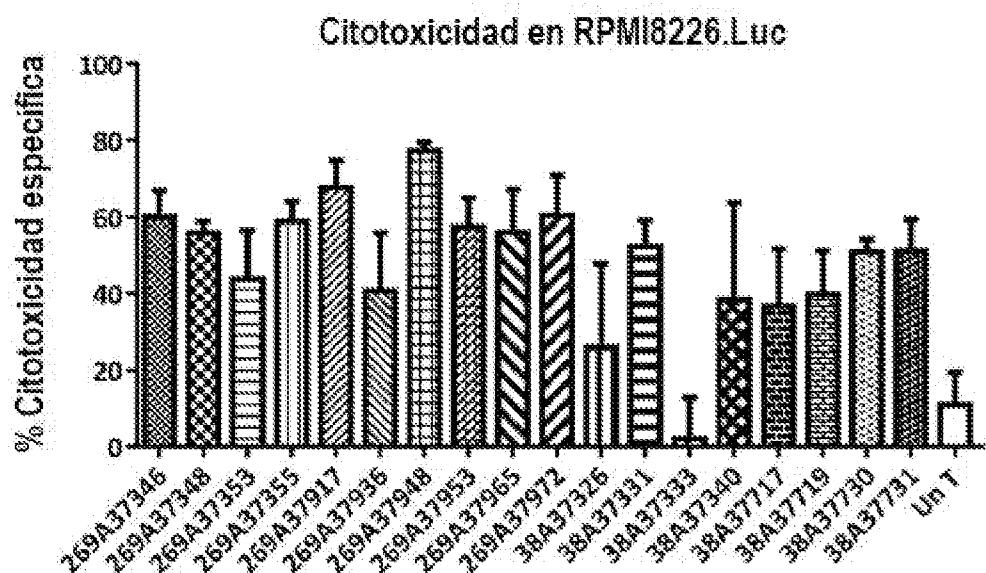


FIG. 2A

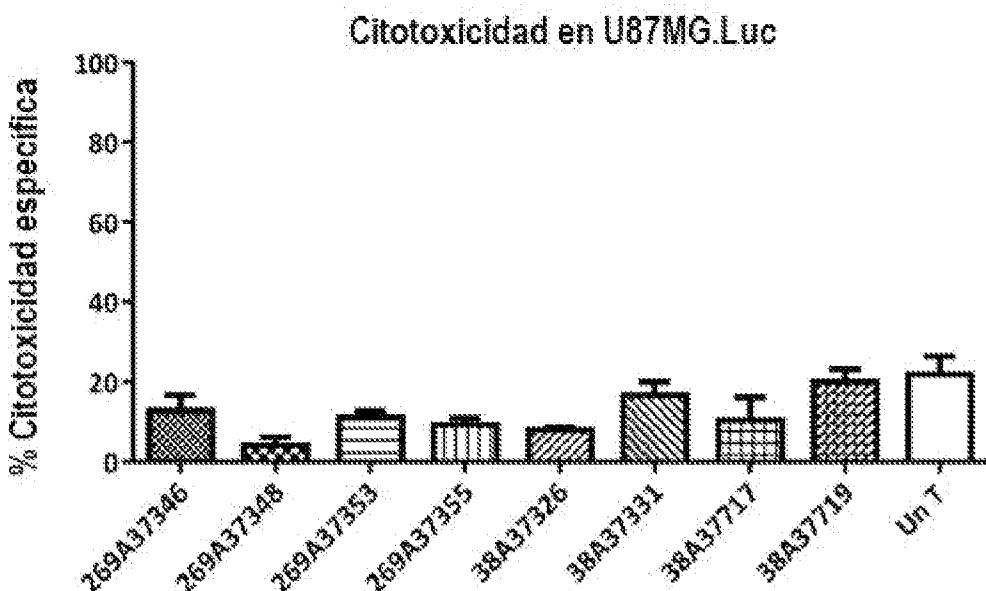


FIG. 2B

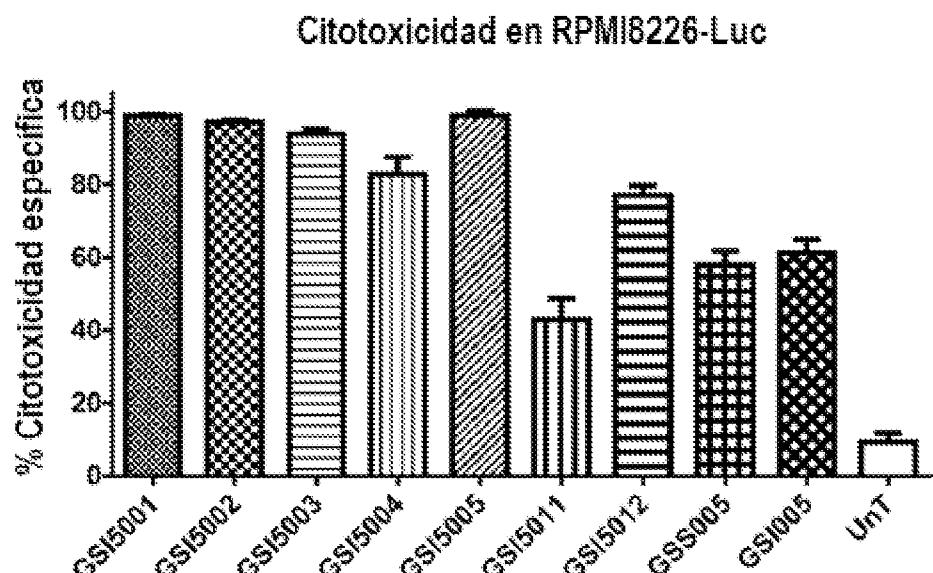


FIG. 3A

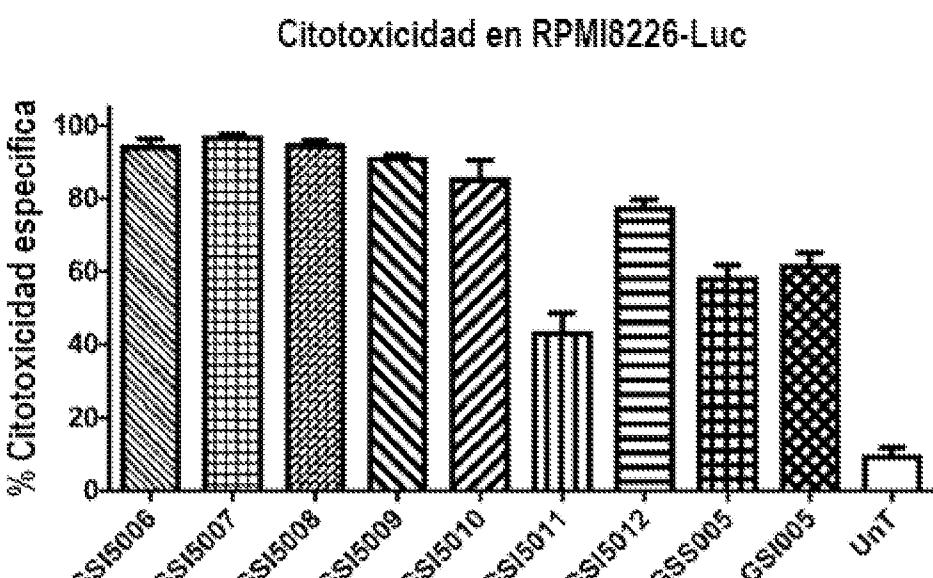


FIG. 3B

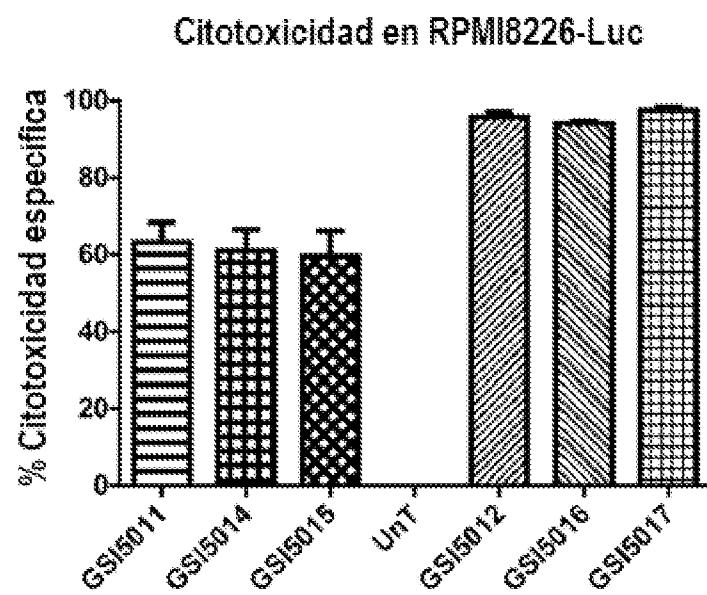
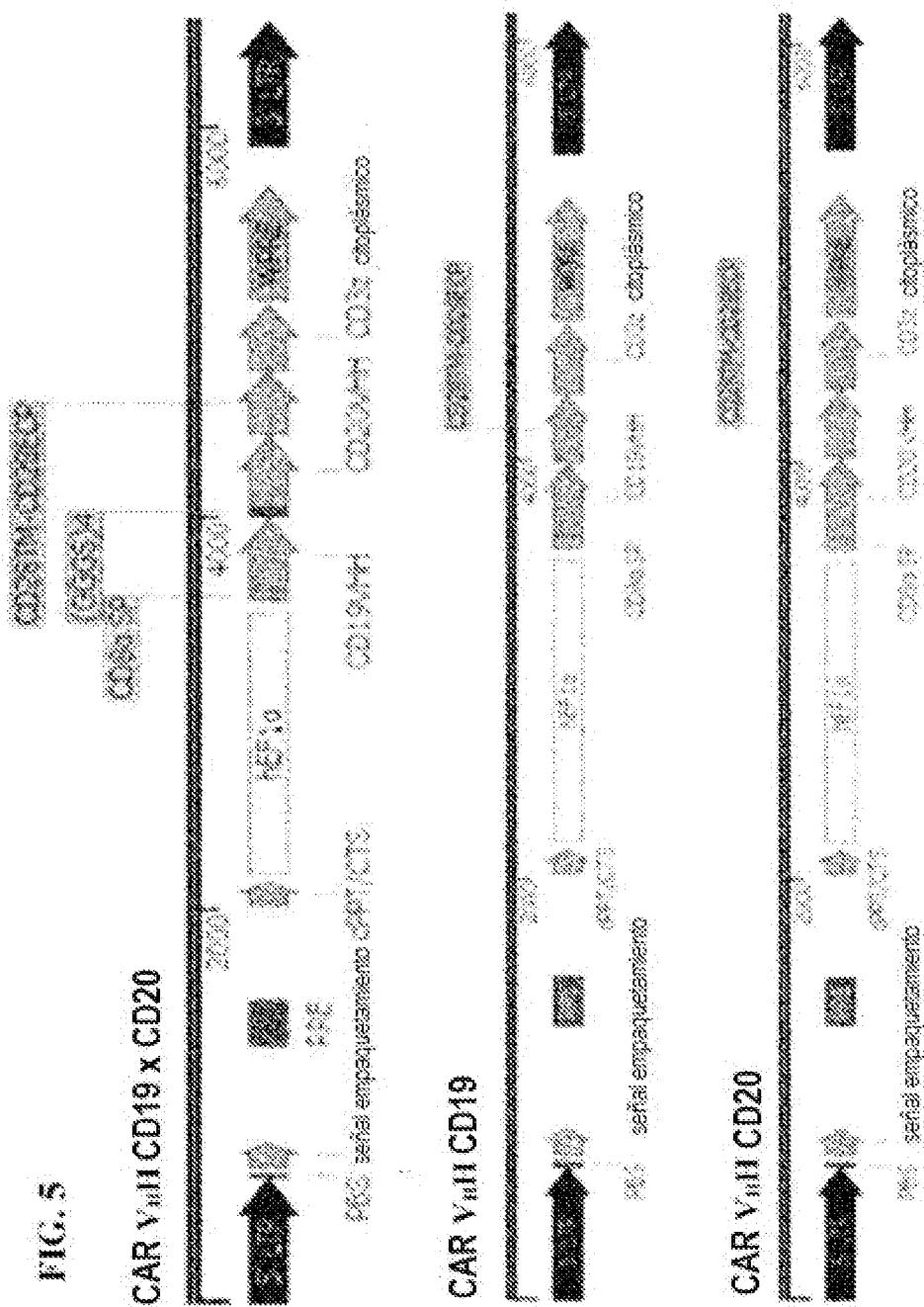


FIG. 4

FIG. 5



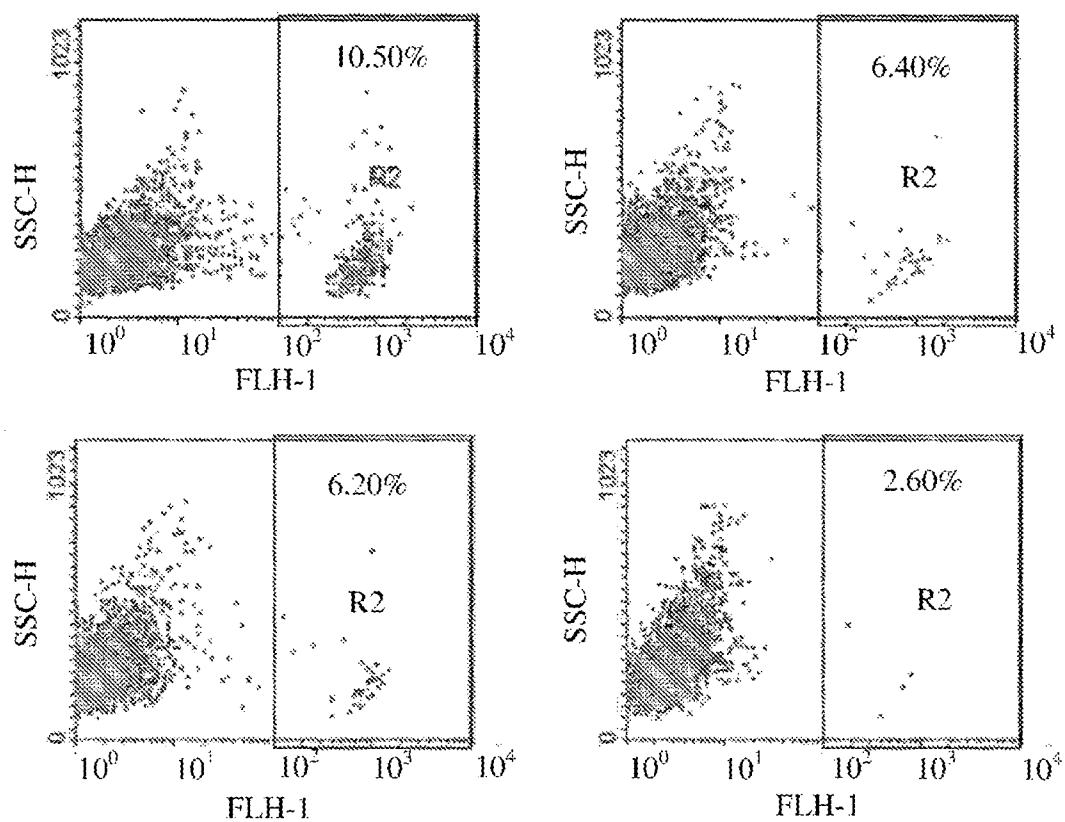


FIG. 6

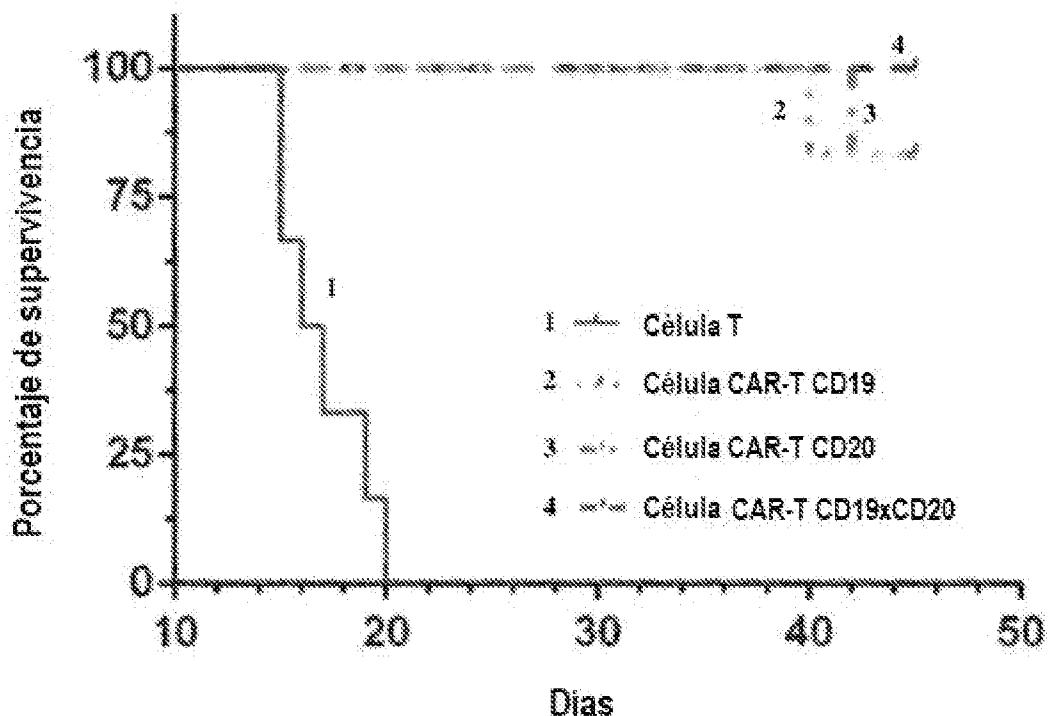


FIG. 7

Citotoxicidad en RPMI8226.Luc

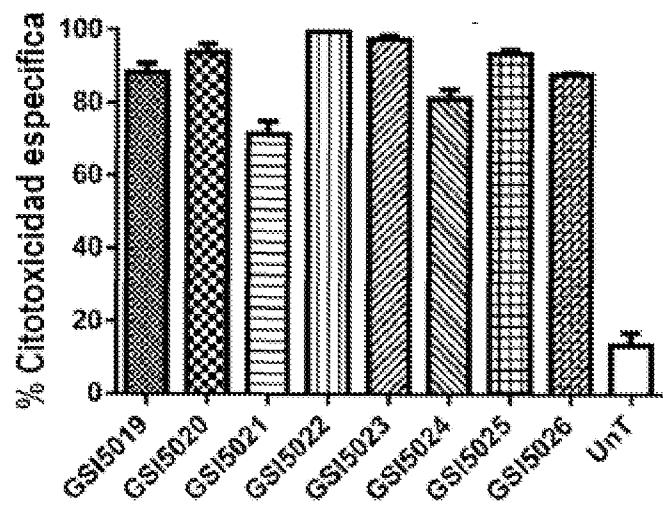


FIG. 8A

Citotoxicidad en U87MG.Luc :

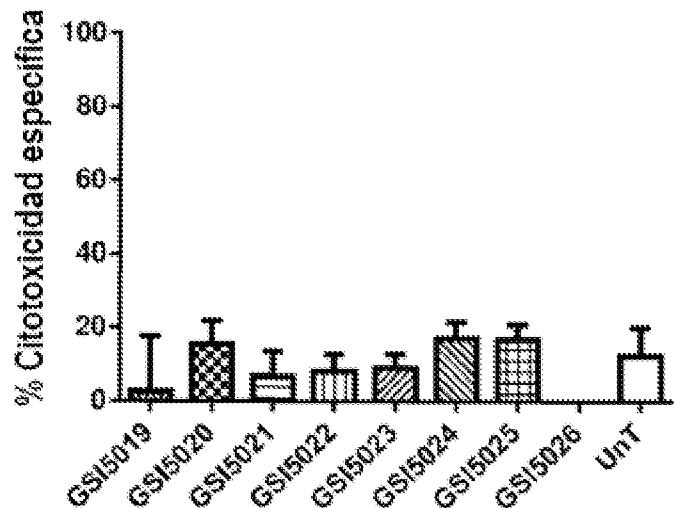


FIG.8B