

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 000 676**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2017** **PCT/US2017/041241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018** **WO18009894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2017** **E 17740873 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024** **EP 3481867**

54 Título: **Proteínas de unión al ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1) y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

07.07.2016 US 201662359612 P

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

03.03.2025

73 Titular/es:

IOVANCE BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.00%)
825 Industrial Road Suite 400
San Carlos, CA 94070, US

72 Inventor/es:

RABINOVICH, BRIAN;
MARTIN-OROZCO, NATALIA y
RADVANYI, LASZLO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 3 000 676 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

Proteínas de unión al ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1) y métodos de uso de las mismas

Introducción

La transferencia de células adoptivas (ACT) es un enfoque de tratamiento en donde las células T autólogas de un paciente se expanden, manipulan *ex vivo*, y luego se reintroducen en el paciente para ejercer una respuesta, por ejemplo, una respuesta antitumoral. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) generalmente se refieren a una población heterogénea de linfocitos que se pueden encontrar en el microambiente del tumor. La razón general de la terapia de ACT con TIL es que la respuesta inmunitaria antitumoral se puede mejorar eliminando células con potencial antitumoral del microambiente tumoral inmunosupresor, expandiendo las células *in vitro*, y luego devolver la población expandida de células a los sitios del tumor para matar las células tumorales y posiblemente otros objetivos celulares que sostienen el tumor, como las células endoteliales vasculares. Lee y Margolin, Curr. Oncol. Rep. 2012; 14(5) 468-474.

La muerte programada 1 (PD-1) es un receptor inhibidor bien descrito expresado en células T humanas activadas que, en cooperación con sus ligandos, el ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando 2 de muerte programada 1 (PD-L2), actúa como un factor de punto de control que limita la actividad antitumoral mediada por células T en una variedad de cánceres humanos, incluido el melanoma. La PD-1 es expresada por los TIL y, como tal, la expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral inhibe la progresión de la enfermedad del cáncer, incluido, por ejemplo, el crecimiento del tumor. E.R. Suárez et al.; Oncotarget, 2016 Jun 7; 7 (23): 34341-55 divulga la administración de una célula CAR-T anti-CAIX humana que está diseñada para expresar una IgG1 o IgG4 anti-PD-L1 en un modelo de ratón ortotópico de carcinoma de células renales humano.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de nuevas composiciones y métodos que interfieran con el efecto inhibidor de la interacción PD-1-PD-L1, por ejemplo, en el contexto de la terapia de ACT utilizando TIL.

Resumen

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento o diagnóstico *in vivo* se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o para diagnóstico *in vivo*.

La presente divulgación proporciona proteínas, tales como anticuerpos, que incluyen una porción de unión a antígeno que se une específicamente al ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1). También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las proteínas y las células (p. ej., linfocitos citotóxicos modificados genéticamente) que incluyen dichos ácidos nucleicos. Un método de este tipo puede incluir la reducción de la interacción entre PD-L1 en una primera célula y PD-1 en una segunda célula. Por ejemplo, los métodos y composiciones proporcionados se pueden utilizar en el tratamiento de infecciones virales y cáncer, tal como el tratamiento de tumores sólidos a través de ACT o mediante la administración de una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1.

Las composiciones y métodos de la presente divulgación pueden permitir que los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente, específicamente los TIL, se propaguen e infundan como una terapia celular que permite la secreción de una proteína de unión a PD-L1 (p. ej., un scFV, un maxicuerpo) en los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente que se administrarán al sujeto. De esta manera, los linfocitos citotóxicos de la presente divulgación son capaces de "liberarse" del efecto inhibidor del punto de control de PD-1, proporcionando un efecto anticancerígeno mejorado en el sujeto al que se administran los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. Proteínas de unión específicas de la divulgación (p. ej., los anticuerpos anti-PD-L1 también se pueden administrar directamente a un individuo, p. ej., inyección intravenosa (iv) o intratumoral.

En un aspecto de la invención, se proporciona una población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, en donde la población de linfocitos citotóxicos es una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y se puede obtener a partir de un método que comprende:

modificar genéticamente un linfocito citotóxico previamente aislado de un tumor del sujeto introduciendo en el linfocito citotóxico un ácido nucleico que codifica una proteína que se une específicamente a PD-L1, en donde el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa y secreta la proteína que se une específicamente a PD-L1;

expandir el linfocito citotóxico modificado genéticamente para generar la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente en donde los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente son una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) modificados genéticamente; en donde la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente es para administración al sujeto para tratar el tumor, en donde la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que se une específicamente a PD-L1 y en donde dicha proteína que se une específicamente a PD-L1 se selecciona de una de las siguientes proteínas:

a) una proteína en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5; y

b) una proteína en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13

5 en donde la proteína se selecciona de un anticuerpo, un maxicuerpo y un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), en donde el anticuerpo de cadena sencilla comprende el primer y segundo polipéptidos de (a) fusionados entre sí directamente o a través de un enlazador o el primer y segundo polipéptidos de (b) fusionados entre sí directamente o a través de un enlazador, y en donde el maxicuerpo comprende un scFv fusionado directamente o a través de un enlazador a un dominio Fc.

10 En ciertas realizaciones, el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de forma constitutiva la proteína que se une específicamente a PD-L1 o en donde el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de forma inducible la proteína que se une específicamente a PD-L1.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico se integra en el genoma del linfocito citotóxico.

15 En ciertas realizaciones, la proteína es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), en donde el anticuerpo de cadena sencilla comprende el primer y segundo polipéptidos fusionados entre sí directamente o a través de un enlazador.

En ciertas realizaciones, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.

20 En ciertas realizaciones, la proteína es un maxicuerpo que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina fusionado directamente o a través de un enlazador a la porción de unión al antígeno y además en donde el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4.

En ciertas realizaciones, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 20.

25 En ciertas realizaciones, la población de linfocitos citotóxicos se utiliza en el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto.

Otros temas

30 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, una proteína que se une específicamente a PD-L1 y comprende una porción de unión al antígeno que comprende: (a) un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 2-4, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 6-8; o (b) un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 10-12, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 14-16, con la excepción de que cada una de las tres secuencias de aminoácidos de CDR del primer y/o segundo polipéptido comprende dos o menos sustituciones de aminoácidos conservadoras en relación con el número de la SEQ ID especificado.

35 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la porción de unión al antígeno comprende un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 2-4, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 6-8.

40 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5.

45 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la porción de unión al antígeno comprende un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 10-12, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 14-16.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13.

50 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el primer polipéptido es una cadena ligera y el segundo polipéptido es una cadena pesada.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la proteína que se une específicamente a PD-L1 es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) y el primer y segundo polipéptidos se fusionan entre sí directamente o a través de un enlazador. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.

- 5 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la proteína que se une específicamente a PD-L1 es un maxicuerpo que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina fusionado directamente o a través de un enlazador a la porción de unión al antígeno. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 20. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG4.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la proteína que se une específicamente a PD-L1 es un anticuerpo humanizado.

- 15 En este documento se describe, pero no se reivindica, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína que se une específicamente a PD-L1, como se analiza en el presente documento. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el ácido nucleico comprende un promotor que está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el promotor es un promotor constitutivo. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el promotor es un promotor inducible.

- 20 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, una célula que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la célula es un linfocito citotóxico modificado genéticamente para expresar y secretar la proteína. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico es una célula T. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la célula T es una célula T CD8+. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la célula T es una célula T colaboradora CD4+. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la célula T se deriva de sangre periférica. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico es una célula asesina natural (NK). En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la NK se deriva de sangre periférica.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico es un linfocito infiltrante de tumores (TIL) derivado de un tumor de un sujeto.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el TIL comprende un receptor específico para un antígeno del tumor.

- 35 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico exhibe un mayor nivel de expresión de uno o más antígenos de activación en relación con una célula T no modificada. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, uno o más antígenos de activación se seleccionan de CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT y HLA-DR.

- 40 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico comprende un receptor de células T específico para un antígeno asociado a un tumor.

- Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método que comprende: modificar genéticamente un linfocito citotóxico aislado de un tumor de un sujeto introduciendo en el linfocito citotóxico el ácido nucleico que codifica una proteína que se une específicamente a PD-L1, en donde el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa y secreta la proteína que se une específicamente a PD-L1; expandir el linfocito citotóxico modificado genéticamente para generar una población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente; y administrar la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente al sujeto para tratar el tumor.

- 50 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de forma constitutiva la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de manera inducible la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el ácido nucleico se integra en el genoma del linfocito citotóxico.

- 55 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico es una célula T. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la célula T es una célula T CD8+. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, la célula T es una célula T colaboradora CD4+. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico es una célula asesina natural (NK).

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente comprende un receptor específico para un antígeno del tumor.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el método comprende aislar el linfocito citotóxico del sujeto antes de modificarlo genéticamente.

- 5 En algunos métodos divulgados en el presente documento, la proteína que se une específicamente a PD-L1 y comprende una porción de unión a antígeno que comprende: (a) un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 2-4, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 6-8; o (b) un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 10-12, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 14-16, con la excepción de que cada una de las tres secuencias de aminoácidos de CDR del primer y/o segundo polipéptido comprende dos o menos sustituciones de aminoácidos conservadoras en relación con el número de la SEQ ID especificado.

- 15 En algunos métodos divulgados en el presente documento, la porción de unión al antígeno comprende un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 2-4, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 6-8.

- 20 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5.

En algunos métodos divulgados en el presente documento, la porción de unión al antígeno comprende un primer polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 10-12, y un segundo polipéptido que comprende las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 14-16.

- 25 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13.

En algunos métodos divulgados en el presente documento, el primer polipéptido es una cadena ligera y el segundo polipéptido es una cadena pesada.

- 30 En algunos métodos divulgados en el presente documento, la proteína es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) y el primer y el segundo polipéptido se fusionan entre sí directamente o a través de un enlazador.

En algunos métodos divulgados en el presente documento, el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.

- 35 En algunos métodos divulgados en el presente documento, la proteína es un maxicuerpo que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina fusionado directamente o a través de un enlazador a la porción de unión al antígeno.

En algunos métodos divulgados en el presente documento, el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1.

- 40 En algunos métodos divulgados en el presente documento, la proteína comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 20.

- 45 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método para producir un linfocito citotóxico modificado genéticamente, comprendiendo el método: modificar genéticamente un linfocito citotóxico aislado de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer introduciendo en el linfocito citotóxico el ácido nucleico que codifica la proteína que se une específicamente a PD-L1, en donde el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa y secreta la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de forma constitutiva la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de manera inducible la proteína que se une específicamente a PD-L1.

- 50 En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el método comprende expandir el linfocito citotóxico *in vitro* para proporcionar una población expandida de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el método comprende aislar el linfocito citotóxico del sujeto antes de la modificación genética.

En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el aislamiento comprende aislar el linfocito citotóxico de un tumor del sujeto. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el aislamiento comprende aislar el linfocito citotóxico de la sangre periférica del sujeto.

5 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el linfocito citotóxico es una célula T. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento del método, la célula T es una célula T CD8+. En algunas divulgaciones del método proporcionadas en el presente documento, la célula T es una célula T colaboradora CD4+. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento del método, el linfocito citotóxico es una célula asesina natural (NK).

10 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el ácido nucleico se integra en el genoma del linfocito citotóxico.

En algunos métodos divulgados en el presente documento, el linfocito citotóxico exhibe un mayor nivel de expresión de uno o más antígenos de activación en relación con una célula T no modificada. En algunos métodos divulgados en el presente documento, los uno o más antígenos de activación se seleccionan entre CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT y HLA-DR.

15 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente comprende un receptor de células T específico para un antígeno de un tumor del sujeto.

20 En el presente documento se divulga, pero no se reivindica, un método para tratar a un individuo que tiene o se sospecha que tiene cáncer, comprendiendo el método: administrar la proteína que se une específicamente a PD-L1 al individuo (por ejemplo, sujeto o paciente, incluyendo, por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano).

En algunos métodos divulgados en el presente documento, la administración comprende introducir en el sujeto un ácido nucleico que codifica la proteína que se une específicamente a PD-L1.

25 En algunos métodos divulgados en el presente documento, la administración comprende introducir en el sujeto un linfocito citotóxico modificado genéticamente que expresa y secreta la proteína que se une específicamente a PD-L1.

30 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de forma constitutiva la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento del método, el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de manera inducible la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento, el método comprende inducir la expresión de la proteína que se une específicamente a PD-L1.

35 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el linfocito citotóxico es una célula T. En algunos métodos divulgados en el presente documento, la célula T es una célula T CD8+. En algunas divulgaciones del método proporcionadas en el presente documento, la célula T es una célula T colaboradora CD4. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento del método, el linfocito citotóxico es una célula asesina natural (NK).

40 En algunos métodos divulgados en el presente documento, el linfocito citotóxico exhibe un mayor nivel de expresión de uno o más antígenos de activación en relación con una célula T no modificada. En algunas divulgaciones proporcionadas en el presente documento del método, los uno o más antígenos de activación se seleccionan entre CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT y HLA-DR.

En algunos métodos divulgados en el presente documento, el linfocito citotóxico modificado genéticamente comprende un receptor de células T específico para un antígeno de un tumor del sujeto.

45 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método para reducir la interacción entre PD-L1 en una primera célula y PD-1 en una segunda célula, comprendiendo el método: poner en contacto PD-L1 en la primera célula con la proteína que se une específicamente a PD-L1.

50 En algunos métodos divulgados en el presente documento, la primera y segunda células se introducen en un individuo, y el contacto comprende administrar la proteína que se une específicamente a PD-L1. En algunos métodos divulgados en el presente documento, la introducción comprende la administración sistémica. En algunos métodos divulgados en el presente documento, la introducción comprende la administración local. En algunos métodos divulgados en el presente documento, la administración local comprende la administración intratumoral. En algunos métodos divulgados en el presente documento, el individuo tiene cáncer. En algunos métodos divulgados en el presente documento, el individuo tiene un tumor sólido.

Breve descripción de los dibujos

La invención se puede entender mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras:

La Figura 1 proporciona una representación esquemática del plásmido lentiviral utilizado para producir 38A1-Fc, 19H9-Fc y FMC63-Fc. Los maxicuerpos anti PD-L1 se codifican más adelante del promotor U3 del promotor de MSCV y más atrás de un casete IRES-eGFP.

La Figura 2 proporciona una representación esquemática del plásmido retroviral utilizado para producir 38A1-Fc, 19H9-Fc y FMC63-Fc. Los maxicuerpos anti PD-L1 se codifican más adelante del promotor U3 del promotor de MSCV y más atrás de un casete IRES-eGFP.

La Figura 3A-3B proporciona datos de ELISA basado en células para determinar la afinidad de 38A1-scFV-Fc y 19H9-scFV-Fc por PD-L1. 293-PD-L1 se tiñeron con 19H9-scFV-Fc (panel A) o 38A1-scFV-Fc (panel B). Los maxicuerpos se titularon de 100 nM a 0.01 nM en 293-PD-L1, se lavaron y se tiñeron con anticuerpo específico anti-Fc γ humano marcado con HRP. La unión se determinó por densidad óptica a 450 nm después de la adición de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). Se utilizó 12D10-scFV-Fc como control negativo.

La Figura 4A-4C proporciona datos que muestran que las células 293-PD-L1 se unen a los maxicuerpos anti-PD-L1 secretados por las células T Jurkat. Las células T Jurkat que expresan de forma estable FMC63-scFV-Fc (panel A), 38A1-scFV-Fc (panel B) o 19H9-scFV-Fc (panel C) se co-cultivaron en una proporción de 1:1 durante 16 horas. Las células se recolectaron y se tiñeron con anticuerpo específico anti-Fc γ humano marcado con Alexa 647. En comparación con el maxicuerpo de control negativo (FMC63-scFV-Fc), se observó un aumento de entre 100 y 300 veces en la intensidad fluorescente media (unión del maxicuerpo) para 19H9-scFV-Fc y 38A1-scFV-Fc, respectivamente.

La Figura 5A-5D proporciona datos que muestran que las células 293-PD-L1 se unen a los maxicuerpos anti-PD-L1 secretados por los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). Los sobrenadante de las líneas TIL M1034 (panel A, panel B) y M1015 (panel C, panel D) expresando de forma estable FMC63-scFV-Fc (panel A, panel C) o 38A1-scFV-Fc (panel B, panel D) se concentraron 10 veces y se usaron para teñir 293-PD-L1. Los maxicuerpos se detectaron utilizando el anticuerpo específico anti-Fc γ humano marcado con Alexa 647. En comparación con el maxicuerpo de control negativo (FMC63-scFV-Fc), observamos un aumento de más de 50 veces en la intensidad fluorescente media (unión del maxicuerpo) para 38A1-scFV-Fc.

La Figura 6 proporciona datos que muestran la capacidad de los maxicuerpos anti-PD-L1 para limitar la inhibición de la actividad de NFAT mediada por PD-L1. Las células T Jurkat que expresan PD1 y luciferasa de luciérnaga más adelante del promotor NFAT se cocultivaron en una proporción de 2:1 con células CHO que expresan PD-L1 y una proteína agonista de células T patentada (kit de bioensayo de bloqueo de PD1/PD-L1, número de catálogo de Promega CS187111) y uno de 12D10-scFV-Fc (control negativo; gris), 19H9-scFV-Fc (rojo), 38A1-scFV-Fc (azul) o el anticuerpo específico de PD1 de control positivo EH12.2H7 (BioLegend; verde). Los maxicuerpos se titularon de 25 μ g/mL a 0.016 μ g/mL. La activación de las células T Jurkat (desinhibición de PD-L1) se midió como actividad bioluminiscente (unidades luminiscentes relativas; RLU) después de la adición de 5'-fluoroluciferina.

La Figura 7 proporciona secuencias de las regiones de unión al antígeno de los anticuerpos 38A1 y 19H9 recién generados, así como ejemplos de proteínas scFV (p. ej., fusiones scFV y scFV-FC) que incluyen las regiones de unión al antígeno 38A1 o 19H9.

La Figura 8 representa un esquema de un ejemplo de un vector de expresión (p. ej., lentivector) que codifica un promotor inducible.

La Figura 9 representa un esquema de un ejemplo de un vector de expresión (p. ej., lentivector) que codifica un promotor inducible.

La Figura 10 proporciona la secuencia del vector vacío para el vector pLEV utilizado como vector ejemplar en los métodos actuales. pLV430G (Vector Lentiviral) (SEQ ID NO: 35) (A) y pCIGO-VSV.G (VSVG) (SEQ ID NO: 36) (B).

La Figura 11A-11B proporciona las secuencias de nucleótidos del vector completas para pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ NO: 37) (A) y pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38) (B).

La Figura 12 proporciona datos que muestran que 19H9 exhibe una mayor capacidad de secreción. Se proporciona una comparación de la capacidad de secreción de las células Jurkat que sobreexpresan el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 versus 38A1. El sobrenadante de las células Jurkat que sobreexpresan el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 y 38A1 se recolectó y se concentró para el ensayo ELISA de IgG para determinar la concentración de ScFV anti-PD-L1. Se encontró que el clon de células Jurkat 19H9 tenía mayor capacidad de secreción en comparación con 38A1 (9.82 versus 6.75 μ g/células).

La Figura 13A-13B proporciona datos que muestran que 38A1 exhibe una mayor capacidad de unión en las células Jurkat que sobreexpresan PD-L1. Se examinó la afinidad de unión del clon ScFV anti-PD-L1 19H9 y 38A1 utilizando células EL4 PD-L1. Las EL4 PD-L1 se incubaron con el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 o 38A1 a concentraciones de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL, y se tiñeron con Amcyan y FITC antihumano de cabra. Las células se lavaron con tampón FAC y se analizaron mediante citometría de flujo. El clon 38A1 exhibió una mayor capacidad de unión en las células Jurkat que sobreexpresaban PD-L1 tanto en el porcentaje de células positivas para PD-L1 (A) como en la media de intensidad de fluorescencia (MFI) (B).

La Figura 14A-14B proporciona datos que muestran que 38A1 exhibe una mayor capacidad de unión en las células tumorales de melanoma. Se proporciona una comparación de la afinidad de unión del clon ScFV anti-PD-L1 19H9 y 38A1 utilizando células EL4 PD-L1. Las EL4 PD-L1 se incubaron con el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 o 38A1 a concentraciones de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL, y se tiñeron con Amcyan y FITC antihumano de cabra. Las células se lavaron con tampón FAC y se analizaron mediante citometría de flujo. El clon 38A1 exhibió una mayor capacidad de unión en las células Jurkat que sobreexpresaban PD-L1 tanto en el porcentaje de células positivas para PD-L1 (A) como en la media de intensidad de fluorescencia (MFI) (B). Para validar la unión de ScFV anti-PD-L1 en células tumorales, se trataron tres células tumorales de melanoma con IFN-gamma (100 ng/mL) para mejorar la expresión de PD-L1. Después de tres días, las células se recolectaron con tampón de disociación celular, se incubaron con el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 o 38A1 a una concentración de 100 ng/mL y se tiñeron con FITC antihumano de cabra. Las células se lavaron con tampón FAC y se analizaron mediante citometría de flujo. Descubrimos que el clon 38A1 exhibió una mayor afinidad de unión tanto en el porcentaje de células positivas para PD-L1 como en MFI. En general, el clon 38A1 tiene una mayor afinidad de unión, pero una capacidad de secreción ligeramente menor en comparación con el clon 19H9.

La Figura 15A-15B proporciona datos que muestran que 38A1 exhibe una mayor función biológica que 19H9. Para determinar más a fondo la función biológica de dos clones de ScFV anti-PD-L1 (19H9 y 38A1), se realizó un ensayo de bloqueo de PD-L1, que se puede utilizar para determinar la potencia del anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 que bloquea la interacción de PD-1 y PD-L1. El ensayo consta de dos líneas celulares modificadas genéticamente: célula efectora PD-1 (células T Jurkat que expresan de forma estable PD-1 humana y luciferasa inducida por NFAT) y células PD-L1 aAPC/CHO-K1 que expresan de forma estable PD-L1 humana con una proteína de superficie celular que activa TCR afines. Cuando se cocultivaron dos tipos de células, la interacción de PD-1 y PD-L1 inhibió la señalización de TCR y disminuyó la actividad de la luciferasa. La adición de un anticuerpo bloqueador anti-PD-1 o PD-L1 ayudó a liberar la señal inhibidora, lo que resultó en una mejor señalización de TCR y actividad de luciferasa mediada por NFAT. Se encontró que la señal de luciferasa (RLU) era mayor cuando se bloqueaba con anti-PD-L1 en comparación con anti-PD1, lo que sugiere que bloquear PD-L1 parecía ser más efectivo que PD-1 en este contexto (A). Como era de esperar, el clon 38A1 de ScFV anti-PD-L1, de que previamente había demostrado tener una mayor afinidad de unión, proporcionó una mayor función biológica debido al gran aumento de la señal de luciferasa tanto en configuraciones de ScFV purificado (P) como no purificado (NP) (B).

La Figura 16 proporciona los mapas vectoriales para pLV4301GPDLV scFV 38A1 (A) y pLV4301GPDLV scFV 19H9 (B).

La Figura 17 proporciona ejemplos de secuencias de IgG1 (SEQ ID NO: 39), IgG2 (SEQ ID NO: 40), IgG3 (SEQ ID NO: 41) e IgG4 (SEQ ID NO: 42).

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona proteínas, tales como anticuerpos, que incluyen una porción de unión a antígeno que se une específicamente al ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1). También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las proteínas y las células (p. ej., linfocitos citotóxicos modificados genéticamente) que incluyen dichos ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, un método de la invención incluye reducir la interacción entre PD-L1 en una primera célula y PD-1 en una segunda célula. Por ejemplo, los métodos y composiciones proporcionados se pueden utilizar en el tratamiento de infecciones virales y cáncer, tal como el tratamiento de tumores sólidos a través de ACT o mediante la administración de una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1.

Las composiciones y métodos de la presente divulgación proporcionan linfocitos citotóxicos modificados genéticamente, específicamente TIL, que pueden propagarse e infundirse como una terapia celular, lo que da como resultado la secreción de una proteína de unión a PD-L1 (p. ej., un scFV, un maxicuerpo y similares) en los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente infundidos en el sujeto. De esta manera, los linfocitos citotóxicos de la presente divulgación son capaces de "liberarse" del efecto inhibitor del punto de control PD-1, proporcionando un efecto anticancerígeno mejorado. Las proteínas de unión específicas de la divulgación (p. ej., anticuerpos anti-PD-L1) también se pueden proporcionar para su administración a un individuo directamente, p. ej., inyección intravenosa (iv) o intratumoral.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior

- e inferior de ese intervalo también se divulga específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en donde uno, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños también está abarcado dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.
- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. Dichos términos se encuentran definidos y utilizados en contexto en varias referencias estándar, incluyendo de manera ilustrativa J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th Ed., 2012; F. M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5th Ed., 2002; B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th Ed., Garland, 2002; D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; y Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004. Aunque se pueden utilizar en la práctica o prueba de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen los métodos y materiales preferidos.
- Tal como se utiliza en el presente documento, cada uno de los términos siguientes tiene el significado asociado a él en esta sección.
- Los artículos "un" y "uno, una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.
- "Aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$ y todavía más preferiblemente $\pm 0.1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.
- El término "efecto antitumoral", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución del volumen del tumor, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la expectativa de vida o una mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. Un "efecto antitumoral" también puede manifestarse por la capacidad de las composiciones y métodos divulgados para prevenir la aparición de tumores en primer lugar.
- El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio e incluye, por ejemplo, una inmunoglobulina intacta o una porción de unión a antígeno de la misma que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique lo contrario. Las porciones que se unen al antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv y anticuerpos de dominio (dAb), y fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (fragmento de dominio variable de cadena sencilla; scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica al polipéptido. El anticuerpo incluye un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un anticuerpo de cadena sencilla, un maxicuerpo (scFv fusionado por un enlazador o unión directa a un Fc o un fragmento de Fc), un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo IgD, un anticuerpo IgE y un anticuerpo IgM y un anticuerpo IgG1 y un anticuerpo IgG2 y un anticuerpo IgG3 y un anticuerpo IgG4 y un anticuerpo IgG4 que tiene al menos una mutación en la región de bisagra que alivia una tendencia a los enlaces disulfuro intra-cadena H.
- Un "fragmento Fab" es un fragmento monovalente que tiene los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd tiene los dominios VH y CH1; un fragmento Fv tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb tiene un dominio VH, un dominio VL o un fragmento de unión a antígeno de un dominio VH o VL.
- Un "anticuerpo de cadena sencilla" (scFv) es un anticuerpo en el que una región VL y una región VH se fusionan directamente o se unen a través de un enlazador (p. ej., una secuencia sintética de residuos de aminoácidos) para formar una cadena proteica continua en donde el enlazador es lo suficientemente largo para permitir que la cadena proteica se pliegue sobre sí misma y forme un sitio de unión al antígeno monovalente (véase, por ejemplo, Bird et al., 1988, *Science* 242: 423-26 y Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 85: 5879-

83). Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, donde cada cadena polipeptídica comprende dominios VH y VL unidos por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, lo que permite que cada dominio se empareje con un dominio complementario en otra cadena polipeptídica (véase, p. ej., Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:6444-48, y Poljak et al., 1994, Structure 2: 1121-23). Si las dos cadenas polipeptídicas de un diacuerpo son idénticas, entonces un diacuerpo resultante de su emparejamiento tendrá dos sitios de unión de antígeno idénticos. Se pueden utilizar cadenas polipeptídicas que tienen diferentes secuencias para formar un diacuerpo con dos sitios de unión al antígeno diferentes. De manera similar, los tricuerpos y tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas polipeptídicas, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes.

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y las regiones marco (FR) de un anticuerpo determinado se pueden identificar utilizando el sistema descrito por Kabat et al. en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991. Se pueden incorporar una o más CDR a una molécula de forma covalente o no covalente para convertirla en una proteína de unión a antígeno. Una proteína de unión a antígeno puede incorporar la(s) CDR(s) como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede unir covalentemente la(s) CDR(s) a otra cadena polipeptídica o puede incorporar la(s) CDR(s) de forma no covalente. Las CDR permiten que la proteína de unión al antígeno se una específicamente a un antígeno de interés particular.

El término "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización, todos los dominios variables y constantes se derivan de secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo completamente humano). Los anticuerpos humanos pueden prepararse de diversas maneras, incluida la inmunización de un ratón modificado genéticamente para expresar anticuerpos humanos. Se pueden diseñar cepas de ratones deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humanos con la expectativa de que dichos ratones produzcan anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humana pueden preservar la gran diversidad genética variable, así como la regulación adecuada de la producción y expresión de anticuerpos. Al explotar la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a las proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas cepas de ratones puede producir anticuerpos totalmente humanos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluidos los antígenos humanos. Utilizando la tecnología del hibridoma, se pueden producir y seleccionar MAb humanos específicos para el antígeno con la especificidad deseada. Los anticuerpos humanos también pueden prepararse seleccionando bibliotecas de anticuerpos humanos expresados en fagos, fagémidos, ribosomas u otras partículas.

Un "anticuerpo humanizado" tiene una secuencia que difiere de la secuencia de un anticuerpo derivado de una especie no humana por una o más sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de aminoácidos, de modo que es menos probable que el anticuerpo humanizado induzca una respuesta inmune y/o induzca una respuesta inmune menos grave, en comparación con el anticuerpo de la especie no humana, cuando se administra a un sujeto humano. En una realización, ciertos aminoácidos en el marco y los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo de especie no humana se mutan para producir el anticuerpo humanizado. En otra realización, el(los) dominio(s) constante(s) de un anticuerpo humano se fusionan con el(los) dominio(s) variable(s) de una especie no humana. Uno o más residuos de aminoácidos en una o más secuencias de CDR de un anticuerpo no humano se pueden cambiar para reducir la probable inmunogenicidad del anticuerpo no humano cuando se administra a un sujeto humano, en donde los residuos de aminoácidos modificados no son críticos para la unión inmunoespecífica del anticuerpo a su antígeno, o los cambios en la secuencia de aminoácidos que se realizan son cambios conservadores, de modo que la unión del anticuerpo humanizado al antígeno no es significativamente peor que la unión del anticuerpo no humano al antígeno. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para fabricar anticuerpos humanizados en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,054,297, 5,886,152 y 5,877,293.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más de otros anticuerpos. Un "anticuerpo injertado con CDR" es un anticuerpo que comprende una o más CDR derivadas de un anticuerpo de una especie o isotipo particular y el marco de otro anticuerpo de la misma o diferente especie o isotipo.

El término " $K_{\text{asociación}}$ " o " K_a ", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " $K_{\text{disociación}}$ " o " K_d ", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " K_D ", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien establecidos en la técnica. El método para determinar la K_D de un anticuerpo puede realizarse mediante resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, mediante un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®.

Como se utiliza en el presente documento, el término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-8} M o menos, en algunas realizaciones, 10^{-9} M o menos, y en algunas realizaciones, 10^{-10} M o menos para un antígeno objetivo. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, en algunas realizaciones, 10^{-8} M o menos, y en algunas realizaciones, 10^{-9} M o menos.

La expresión "constitutiva" incluye un estado en el que un producto genético se produce en una célula viva en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Una "región codificante" de un gen incluye los residuos de nucleótidos de la cadena codificante del gen y los nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos o complementarios, respectivamente, a la región codificante de una molécula de ARNm que se produce por transcripción del gen. Una "región codificante" de una molécula de ARNm también incluye los residuos de nucleótidos de la molécula de ARNm que coinciden con una región anticodón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de ARNm o que codifican un codón de terminación. La región codificante puede por lo tanto incluir residuos de nucleótidos que comprenden codones para residuos de aminoácidos que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (p. ej., residuos de aminoácidos en una secuencia señal de exportación de proteínas).

Por "linfocitos infiltrantes de tumores" o "TIL" en el presente documento se entiende una población de células obtenidas originalmente como glóbulos blancos que han abandonado el torrente sanguíneo de un sujeto y han migrado a un tumor. Los TIL incluyen, pero no se limitan a, células T citotóxicas CD8+ (linfocitos), células T CD4+ Th1 y Th17, células asesinas naturales, células dendríticas y macrófagos M1. Los TIL incluyen tanto TIL primarios como secundarios. Los "TIL primarios" son aquellos que se obtienen de muestras de tejido del paciente como se describe en el presente documento (a veces denominados "recién cosechados"), y los "TIL secundarios" son cualquier población de células TIL que se haya expandido o proliferado como se describe en el presente documento, incluidos, pero no se limitan a, los TIL en masa y los TIL expandidos ("TIL REP") como se describe en el presente documento.

Los TIL generalmente se pueden definir bioquímicamente, utilizando marcadores de superficie celular, o funcionalmente, por su capacidad de infiltrarse en tumores y efectuar el tratamiento. Los TIL se pueden clasificar generalmente de acuerdo con la expresión de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 y CD25. Además, y como alternativa, los TIL pueden definirse funcionalmente por su capacidad de infiltrarse en tumores sólidos tras su reintroducción en un paciente.

El término "linfocito citotóxico" incluye las células T citotóxicas (CTL) (incluidas los linfocitos T citotóxicos CD8+ y linfocitos T colaboradores CD4+), células T asesinas naturales (NKT) y células asesinas naturales (NK). Los linfocitos citotóxicos pueden incluir, por ejemplo, células T $\alpha\beta$ derivadas de sangre periférica positivas para TCR o $\gamma\delta$ positivas para TCR activadas por antígenos asociados a tumores y/o transducidas con receptores de antígenos quiméricos específicos de tumores o receptores de células T, y linfocitos infiltrantes de tumores (TEL). Los linfocitos citotóxicos generalmente matan células cancerosas, células infectadas (particularmente con virus) o células que están dañadas o defectuosas. Un linfocito citotóxico también puede denominarse célula T citotóxica, TC, linfocito T citotóxico, CTL, célula T asesina, célula T citolítica, célula T CD8+ o célula T asesina es un linfocito T (un tipo de glóbulo blanco).

Los términos "fragmentar", "fragmento" y "fragmentado", tal como se utilizan en el presente documento para describir procesos para desmembrar un tumor, incluyen métodos de fragmentación mecánica tales como triturar, cortar, dividir y morcelar el tejido tumoral, así como cualquier otro método para desmembrar la estructura física del tejido tumoral.

El término "*in vivo*" se refiere a un evento que tiene lugar en el cuerpo de un sujeto.

El término "*in vitro*" se refiere a un evento que tiene lugar fuera del cuerpo de un sujeto. Los ensayos *in vitro* abarcan ensayos basados en células en los que se emplean células vivas o muertas y también pueden abarcar un ensayo sin células en el que no se emplean células intactas.

El término "anticuerpo anti-CD3" se refiere a un anticuerpo o variante del mismo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal e incluye anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos que se dirigen contra el receptor de CD3 en el receptor de antígeno de células T de las células T maduras. Los anticuerpos anti-CD3 incluyen OKT-3, también conocido como muromonab. Otros anticuerpos anti-CD3 incluyen, por ejemplo, oteixizumab, teplizumab y visilizumab.

El término "OKT-3" (también denominado en el presente documento "OKT3") se refiere a un anticuerpo monoclonal o biosimilar o variante del mismo, incluidos anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos o murinos, dirigidos contra el receptor de CD3 en el receptor de antígeno de células T maduras, e incluye formas disponibles comercialmente tales como OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 puro, Miltenyi Biotec, Inc., San

Diego, CA, EE. UU.) y muromonab o variantes, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas o biosimilares del mismo. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de muromonab se dan en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28). Un hibridoma capaz de producir OKT-3 se deposita en la Colección Americana de Cultivos Tipo y se le asigna el número de acceso ATCC CRL 8001. Un hibridoma capaz de producir OKT-3 también está depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC) y se le asigna el número de catálogo 86022706.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de muromonab.

Identificador	Secuencia (símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO: 27	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVRQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNV 60
Cadena pesada de muromonab	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVIYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120
	KITAPSVYPL APVCGGTTGS SVFLGCLVKG YFPBPVTLTW NSGSLSSGVH TTPAVLQSDI 180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSTI CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHSTCP PCPAPELLGG 240
	PSVFLFPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300
	STYRVSVLT VLGQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPTEKTLIS KAKGQPREPQ VYTLPPSPDE 360
	LTNQGSLTC LVKGFYPSDI AVEVESNGQP ENNYKTTTPV LDSOGSFFLY SKLTVDKSRW 420
	QQGNVFSCSV MHEALNNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 28	QIVLTQSPAI MSASPGERVT MTCASASSVS YMHNYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60
Cadena ligera de muromonab	FRSGSGTSEY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPETFGSG TKLEINPDT APTVSIFPDS 120
	SEQLTSGGAS VVCFLNHYF KGINVKWLD GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TISMSTTL 180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSENR NEC 213

El término "IL-2" (también denominado en el presente documento como "II,2") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-2, e incluye todas las formas de IL-2, incluidas las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicoformas, biosimilares y variantes de las mismas. La IL-2 se describe, por ejemplo, en Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 y Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79. La secuencia de aminoácidos de IL-2 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 3). Por ejemplo, el término IL-2 abarca formas humanas recombinantes de IL-2, como la aldesleucina (PROLEUKIN, disponible comercialmente de múltiples proveedores en viales de un solo uso de 22 millones de dosis), así como la forma de IL-2 recombinante suministrada comercialmente por CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, EE. UU. (CELLGRO GMP) o ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE. UU. (Cat. No. CYT-209-b) y otros equivalentes comerciales de otros proveedores. La aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana) es una forma recombinante humana no glicosilada de IL-2 con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. La secuencia de aminoácidos de la aldesleucina adecuada para su uso en la invención se da en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 30). El término IL-2 también abarca las formas pegiladas de IL-2, como se describe en el presente documento, incluido el profármaco de IL2 pegilado NKTR-214, disponible a través de Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, EE. UU. NKTR-214 y la IL-2 pegilada adecuados para su uso en la invención se describen en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos No. US 2014/0328791 A1 y la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 2012/065086 A1. Se describen formas alternativas de IL-2 conjugada adecuadas para su uso en la invención en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 y 4,902,502. Las formulaciones de IL-2 adecuadas para su uso en la invención se describen en la patente de los Estados Unidos No. 6,706,289.

Como se usa en el presente documento, las interleucinas incluyen IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 e IL-21. En la Tabla 2 se proporcionan secuencias ejemplares para estas interleucinas.

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de las interleucinas.

Identificador	Secuencia (Símbolos de aminoácidos de una letra)
SEQ ID NO 29	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLD LQMI LGIN NYKNPKLTPT LTFKYMPPK ATELKHLQCL 60
IL-2 humana recombinante (rhIL-2)	EEELKPLEEV LNLAKSNFHL LRPDLISNI NVIVLELRGS ETFMCEYAD ETATVEFLN 120
	RWITFCQSII SLT 134
SEQ ID NO: 30	PTSSSTKKTK LQLEHLLD LQMI LGIN NYKNPKLTPT LTFKYMPPK ATELKHLQCL 60
Aldelesleucina (Proleukin®)	ELKPLEEV LNLAKSNFHL LRPDLISNI NVIVLELRGS ETFMCEYAD ETATVEFLN 120
	ITFSQSIIIS LT 132

SEQ ID NO: 31	MHRCDITLQE IXTLNSLITE QXTLCETELTV TDIFAASKNT TERETFCRAA TVLRQFYSHH	60
IL-4 humana recombinante (rhIL-4)	EKDTROCLGAT AQQPHRHKQL IRFLKRLDPN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI	120
	MREKYSKCSS	130
SEQ ID NO: 32	MDCDIEGRDG KQYESVLMVS IDQLLESMKE IGSNCLNNEF NPFKRHICDA NKEGMFLFPA	60
IL-7 humana recombinante (rhIL-7)	ARKLRQFLNM NSTGDFDLHL LKVSEGTTEL LNETGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL	120
	KEQKKLNDLC FLKRLLEQYK TCWNKILMGT KEM	153
SEQ ID NO: 33	MNWVNVISDL KRIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MRCFLLELQV ISLESQDASI	60
IL-15 humana recombinante (rhIL-15)	HETVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEKNIXEF LQSFVHVQM FINTS	115
SEQ ID NO: 34	MQDRHMIEMR QLEDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG	60
IL-21 humana recombinante (rhIL-21)	NNERILNVS I KKLKRRPST NAGRRQKHRL TPCSCDSYEK NPKKEELERF KSLDQKMINQ	120
	HLSSRTHGSE DS	132

El término "IL-4" (también denominado en el presente documento como "IL4") se refiere a la citocina conocida como interleucina 4, que es producida por las células T Th2 y por los eosinófilos, basófilos y mastocitos. IL-4 regula la diferenciación de células T colaboradoras no modificadas (células Th0) a células T Th2. Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70. Tras la activación por IL-4, las células T Th2 posteriormente producen IL-4 adicional en un ciclo de retroalimentación positiva. La IL-4 también estimula la proliferación de células B y la expresión de MHC de clase II, e induce el cambio de clase a la expresión de IgE e IgG1 de las células B. La IL-4 humana recombinante adecuada para su uso en la invención está disponible comercialmente de múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE. UU. (Cat. No. CYT-211) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU. (proteína recombinante IL-15 humana, Cat. No. Gibco CTP0043). La secuencia de aminoácidos de IL-4 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 31).

El término "IL-7" (también denominado en el presente documento "IL7") se refiere a una citocina derivada de tejido glicosilada conocida como interleucina 7, que puede obtenerse de células estromales y epiteliales, así como de células dendríticas. Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904. IL-7 puede estimular el desarrollo de células T. La IL-7 se une al receptor de IL-7, un heterodímero que consiste en el receptor alfa de IL-7 y el receptor de cadena gamma común, que envía una serie de señales importantes para el desarrollo de las células T dentro del timo y la supervivencia dentro de la periferia. La IL-4 humana recombinante adecuada para su uso en la invención está disponible comercialmente de múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE. UU. (Cat. No. CYT-254) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU. (proteína recombinante IL-15 humana, Cat. N.º Gibco PHC0071). La secuencia de aminoácidos de IL-7 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 32).

El término "IL-15" (también denominado en el presente documento como "IL15") se refiere al factor de crecimiento de células T conocido como interleucina-15, e incluye todas las formas de IL-2, incluidas las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicofomas, biosimilares y variantes de las mismas. IL-15 se describe, por ejemplo, en Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32. IL-15 comparte subunidades del receptor de señalización β y γ con IL-2. La IL-15 humana recombinante es una cadena polipeptídica única, no glicosilada, que contiene 114 aminoácidos (y una metionina del terminal N) con una masa molecular de 12.8 kDa. La IL-15 humana recombinante está disponible comercialmente a través de múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE. UU. (Cat. No. CYT-230-b) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU. (proteína recombinante IL-15 humana, Cat. Núm. 34-8159-82). La secuencia de aminoácidos de la IL-15 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 33).

El término "IL-21" (también denominado en el presente documento "IL21") se refiere a la proteína citocina pleiotrópica conocida como interleucina-21, e incluye todas las formas de IL-21, incluidas las formas humanas y de mamíferos, sustituciones conservadoras de aminoácidos, glicofomas, biosimilares y variantes de las mismas. La IL-21 se describe, por ejemplo, en Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95. La IL-21 es producida principalmente por células T asesinas naturales y células T CD4+ humanas activadas. La IL-21 humana recombinante es una cadena polipeptídica única, no glicosilada, que contiene 132 aminoácidos con una masa molecular de 15.4 kDa. La IL-21 humana recombinante está disponible comercialmente a través de múltiples proveedores, incluidos ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, EE. UU. (Cat. No. CYT-408-b) y ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU. (proteína recombinante IL-21 humana, Cat. Núm. 14-8219-80). La secuencia de aminoácidos de IL-21 humana recombinante adecuada para su uso en la invención se proporciona en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 34).

Una "enfermedad" incluye un estado de salud de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis y en donde, si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose.

Por el contrario, un "trastorno" en un animal incluye un estado de salud en donde el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en donde su estado de salud es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no necesariamente provoca un deterioro mayor del estado de salud del animal.

Una enfermedad o trastorno se "alivia" si se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que el paciente experimenta dicho síntoma, o ambas.

Con respecto a los métodos inventivos, el término "tumor" o "cáncer" puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de los siguientes: cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrecto, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de cuello uterino, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de tejidos blandos, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter, cáncer de vejiga urinaria y cáncer del tracto digestivo como, por ejemplo, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de la cavidad oral, cáncer de colon y cáncer hepatobiliar. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma metastásico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluidos, pero no se limitan a, los mamíferos del orden *Rodentia*, tal como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden *Logomorpha*, como los conejos. En algunas realizaciones, los mamíferos son del orden *Carnivora*, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros). En algunas realizaciones, los mamíferos son del orden *Artiodactyla*, incluidos los bovinos (vacas) y los porcinos (cerdos) o del orden *Persodactyla*, incluidos los equinos (caballos). Lo más preferible es que los mamíferos sean del orden *Primates*, *Ceboids*, o *Simoids* (monos) o del orden *Anthropoids* (humanos y simios). En algunas realizaciones, el mamífero es el ser humano.

El término "regresión", así como las palabras derivadas del mismo, tal como se utilizan en el presente documento, no implican necesariamente una regresión del 100 % o completa. Más bien, existen diversos grados de regresión que una persona con conocimientos ordinarios en la materia reconoce como poseedores de un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este respecto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de regresión del cáncer en un mamífero. Además, la regresión proporcionada por el método de la invención puede incluir la regresión de una o más condiciones o síntomas de la enfermedad, p. ej., cáncer. Además, para los fines del presente documento, "regresión" puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o retrasar la aparición de un síntoma y/o retrasar la aparición de una condición de la misma.

Una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" de una composición incluye aquella cantidad de la composición que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra la composición. Una "cantidad efectiva" de un vehículo de administración incluye aquella cantidad suficiente para unir o administrar eficazmente una composición.

"Codificación" incluye la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de ella. Así, un gen codifica una proteína si, por ejemplo, la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y que normalmente se proporciona en los listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden considerarse como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Tal como se utiliza en el presente documento, "endógeno" incluye cualquier material procedente o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "exógeno" incluye cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

Un "casete de expresión" incluye cualquier constructo de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen/secuencia codificante de interés, que está operativamente vinculado a un promotor del casete de expresión. Estos casetes se pueden construir en un "vector", "constructo vectorial", "vector de expresión" o

"vector de transferencia de genes" para transferir el casete de expresión a las células objetivo. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento", aplicado a un ácido nucleico o polipéptido, incluye una subsecuencia de un ácido nucleico o polipéptido más grande. Un "fragmento" de un ácido nucleico puede tener una longitud de al menos aproximadamente 15 nucleótidos; por ejemplo, de al menos aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos; de al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos, de al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 nucleótidos, de al menos aproximadamente 1000 nucleótidos a aproximadamente 1500 nucleótidos; o de aproximadamente 1500 nucleótidos a aproximadamente 2500 nucleótidos; o de aproximadamente 2500 nucleótidos (y cualquier valor entero intermedio). Un "fragmento" de un polipéptido puede tener una longitud de al menos aproximadamente 15 aminoácidos; por ejemplo, de al menos aproximadamente 50 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos; de al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 500 aminoácidos, de al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 aminoácidos, de al menos aproximadamente 1000 aminoácidos a aproximadamente 1500 aminoácidos; o de aproximadamente 1500 aminoácidos a aproximadamente 2500 aminoácidos; o aproximadamente 2500 aminoácidos (y cualquier valor entero intermedio).

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "gen" y "gen recombinante" incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido. Estas variaciones alélicas naturales normalmente pueden dar lugar a una variación de 1-5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen determinado. Se pueden identificar alelos alternativos secuenciando el gen de interés en varios individuos diferentes. Esto puede llevarse a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una variedad de individuos. Todas y cada una de estas variaciones de nucleótidos y polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional se consideran dentro del alcance de la invención.

"Homólogo", como se utiliza en el presente documento, incluye la similitud de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, p. ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, p. ej., dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, p. ej., si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, p. ej., si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias compuestas son homólogas, entonces las dos secuencias son 50 % homólogas, si el 90 % de las posiciones, p. ej., 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten un 90 % de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 5'-ATTGCC-3' y 5'-TATGGC-3' comparten una homología del 50 %.

La expresión "inducible" incluye un estado en donde un producto genético se produce en una célula viva en respuesta a la presencia de una señal en la célula.

Como se utiliza en el presente documento, un "material instructivo" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda utilizarse para comunicar la utilidad y/o el uso de un compuesto, composición, vector o sistema de administración de la presente divulgación en un kit de acuerdo con la presente divulgación, p. ej., un kit para aliviar las diversas enfermedades o trastornos citados en el presente documento. Opcionalmente, o alternativamente, el material instructivo puede describir uno o más métodos para aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material instructivo del kit divulgado en el presente documento puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contenga el compuesto, la composición, el vector o el sistema de administración identificados de la invención o enviarse junto con un recipiente que contenga el compuesto, la composición, el vector o el sistema de administración identificados. Alternativamente, el material de instrucción puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material de instrucción y el compuesto sean utilizados de manera cooperativa por el destinatario.

El término "ácido nucleico" incluye moléculas de ARN o ADN que tienen más de un nucleótido en cualquier forma, incluyendo oligonucleótidos o polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios. El término "secuencia de nucleótidos" incluye el ordenamiento de los nucleótidos en un oligonucleótido o polinucleótido en una forma monocatenaria de ácido nucleico.

Por "constructo de ácido nucleico" se entiende una secuencia de ácido nucleico que se ha construido para comprender una o más unidades funcionales que no se encuentran juntas en la naturaleza. Los ejemplos incluyen moléculas de ADN extracromosómico circular, lineal y de doble cadena (plásmidos), cósmidos (plásmidos que contienen secuencias COS del fago lambda), genomas virales que incluyen secuencias de ácidos nucleicos no nativos y similares.

El término "operativamente unido" como se utiliza en el presente documento incluye un polinucleótido en relación funcional con un segundo polinucleótido, p. ej., una fracción de ácido nucleico monocatenario o

bicatenario que comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro de la fracción de ácido nucleico de tal manera que al menos uno de los dos polinucleótidos es capaz de ejercer un efecto fisiológico por el cual se caracteriza, sobre el otro. A modo de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región codificante de un gen es capaz de promover la transcripción de la región codificante. El orden especificado al indicar el enlace operativo no es importante. Por ejemplo, las frases: "el promotor está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos" y "la secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor" se utilizan indistintamente en el presente documento y se consideran equivalentes. En algunos casos, cuando el ácido nucleico que codifica la proteína deseada comprende además una secuencia promotora/reguladora, la secuencia promotora/reguladora se posiciona en el extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína deseada de manera que impulsa la expresión de la proteína deseada en una célula.

Los términos "oligonucleótido", "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico", utilizados indistintamente en el presente documento, se refieren a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, pero no se limita a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. La estructura principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como los que normalmente se encuentran en el ARN o el ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, la estructura principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamiditas y/o fosforotioatos, y por lo tanto puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Peyrottes et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:1841-1848; Chaturvedi et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24: 2318-2323. El polinucleótido puede comprender uno o más L-nucleósidos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tal como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, y puede estar interrumpido por componentes no nucleótidos. Si están presentes, se pueden impartir modificaciones a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polímero. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tal como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de enlace como fluororribosa y tioato, y ramificaciones de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede verse interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse aún más después de la polimerización, como por ejemplo mediante conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los protectores, la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcado, otros polinucleótidos o un soporte sólido. Siempre que un polinucleótido u oligonucleótido esté representado por una secuencia de letras (mayúsculas o minúsculas), tal como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5'→3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, "I" denota desoxiinosina, "U" denota uridina, a menos que se indique lo contrario o sea obvio a partir del contexto. A menos que se indique lo contrario, la terminología y las convenciones de numeración de átomos seguirán las divulgadas en Strachan and Read, Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss, Nueva York, 1999). Los polinucleótidos pueden ser simples, dobles o triples, lineales o circulares y pueden tener cualquier longitud. Al discutir polinucleótidos, una secuencia o estructura de un polinucleótido particular puede describirse en el presente documento de acuerdo con la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

El término "recombinante", tal como se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de varias combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligadura, y otros procedimientos que dan como resultado un constructo distinto y/o diferente de un polinucleótido que se encuentra en la naturaleza. Los términos incluyen respectivamente réplicas del constructo del polinucleótido original y progenie del constructo del virus original.

El término "proteína de unión al ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1)" se refiere a un polipéptido (p. ej., una proteína de fusión, un scFV, un maxicuerpo, un anticuerpo y similares), que es capaz de unirse específicamente a la proteína del ligando 1 de muerte programada 1 (PD-L1) (también conocida como CD274 o B7-H1) expresada en la superficie de una célula.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", utilizados indistintamente en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados o derivatizados química o bioquímicamente y polipéptidos que tienen cadenas principales de péptidos modificados. El término incluye cadenas polipeptídicas modificadas o derivatizadas de cualquier manera, incluyendo, pero sin limitarse a, glicosilación, formilación, ciclización, acetilación, fosforilación y similares. El término incluye péptidos naturales, péptidos sintéticos y péptidos que comprenden uno o más análogos de aminoácidos. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo, pero no limitado a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líderes heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina del terminal N; proteínas marcadas inmunológicamente; y similares.

El término "antígeno asociado a tumores" es un término bien conocido en la técnica y se refiere a moléculas que se sobreexpresan de manera diferencial en las células tumorales en relación con las células no cancerosas

del mismo tipo de célula. Tal como se utiliza en el presente documento, "antígeno asociado a tumores" incluye no sólo antígenos completos asociados a tumores que pueden expresarse en la superficie celular, sino también porciones (fragmentos) de los mismos que comprenden epítomos que son reconocidos por las células T. Un antígeno asociado a un tumor (TAA) puede ser uno que se encuentra en la naturaleza, o puede ser una versión sintética de un TAA que se encuentra en la naturaleza, o puede ser una variante de un TAA que se encuentra de forma natural, p. ej., una variante que tiene propiedades inmunogénicas mejoradas. La TAA puede ser una proteína sobreexpresada de origen natural o una proteína mutada expresada únicamente en células tumorales u otras células transformadas en tumores.

El término "promotor" tal como se utiliza en el presente documento incluye una secuencia de ADN unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir, tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula deseada. Un promotor generalmente se ubica más adelante de una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y proporciona un sitio para la unión específica de la ARN polimerasa y otros factores de transcripción.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los "polipéptidos", "proteínas" y "péptidos" codificados por las "secuencias de polinucleótidos" incluyen secuencias nativas de longitud completa, como las proteínas naturales, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencia siempre que la subsecuencia, la forma modificada o la variante conserven algún grado de funcionalidad de la proteína nativa de longitud completa. En los métodos y usos descritos en el presente documento, dichos polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias de polinucleótidos pueden ser, pero no es necesario que sean, idénticos a la proteína endógena defectuosa, o cuya expresión es insuficiente o deficiente en el mamífero tratado. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos modificado; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, fosforilación, metilación, carboxilación, desamidación, acetilación o conjugación con un componente de marcado. Los polipéptidos tales como polipéptidos antiangiogénicos, polipéptidos neuroprotectores y similares, cuando se analizan en el contexto de la administración de un producto génico a un sujeto mamífero, y las composiciones para los mismos, se refieren al polipéptido intacto respectivo, o cualquier fragmento o derivado genéticamente modificado del mismo, que conserva la función bioquímica deseada de la proteína intacta.

Un "polipéptido recombinante" incluye uno que se produce tras la expresión de un polinucleótido recombinante.

El término "se une específicamente", tal como se utiliza en el presente documento, p. ej., con respecto a una región de unión de anticuerpo/antígeno, incluye una región de unión de anticuerpo/antígeno que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo (p. ej., un scFV) que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies diferentes. Pero dicha reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. Como otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico.

En algunos casos, los términos "que se une de forma específica" o "que se une específicamente" se pueden utilizar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (p. ej., un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo sintético" tal como se utiliza en el presente documento incluye un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago. El término también debe interpretarse en el sentido de que significa un anticuerpo que ha sido generado por la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido utilizando tecnología de ADN sintético o de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

"Variante", tal como se utiliza el término en el presente documento, incluye una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de péptidos que difiere en secuencia de una secuencia de ácido nucleico o secuencia de péptidos de referencia respectivamente, pero conserva propiedades biológicas esenciales de la molécula de referencia. Los cambios en la secuencia de una variante de ácido nucleico no pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por el ácido nucleico de referencia, o pueden resultar en sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos. Los cambios en la secuencia de variantes de péptidos suelen ser limitados o conservadores, de modo que las secuencias del péptido de referencia y la variante son muy similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Un péptido variante y de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos mediante una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones en

cualquier combinación. Una variante de un ácido nucleico o péptido puede ser una variante de origen natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que exista de forma natural. Se pueden crear variantes no naturales de ácidos nucleicos y péptidos mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

- 5 Una "sustitución" resulta del reemplazo de uno o más aminoácidos o nucleótidos por aminoácidos o nucleótidos diferentes, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos de un polipéptido. Si una sustitución es conservadora, el aminoácido que se sustituye en un polipéptido tiene propiedades estructurales o químicas similares (p. ej., carga, polaridad, hidrofobicidad y similares) al aminoácido que está sustituyendo. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales
- 10 ("sustituciones conservadoras de aminoácidos") generalmente dan como resultado una sustitución de un primer aminoácido por un segundo aminoácido del mismo grupo que el primer aminoácido, donde los ejemplos de grupos de aminoácidos son los siguientes: (1) aminoácidos ácidos (con carga negativa) como el ácido aspártico y el ácido glutámico; (2) aminoácidos básicos (con carga positiva) como la arginina, la histidina y la lisina; (3) aminoácidos polares neutros como la glicina, la serina, la treonina, la cisteína, la tirosina, la asparagina y la glutamina; y (4) aminoácidos no polares neutros como la alanina, la leucina, la isoleucina, la valina, la prolina, la fenilalanina, el triptófano y la metionina. Las variantes de polipéptidos pueden tener cambios "no conservadores", donde el aminoácido sustituido difiere en propiedades estructurales y/o químicas.

- 20 Una "eliminación" se define como un cambio en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos en donde uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, están ausentes en comparación con una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos de un polipéptido o polinucleótido de origen natural. En el contexto de una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos, una eliminación puede implicar la eliminación de 2, 5, 10, hasta 20, hasta 30 o hasta 50 o más aminoácidos o residuos de nucleótidos, teniendo en cuenta la longitud de la secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que se está modificando.

- 25 Una "inserción" o "adición" es aquel cambio en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ha resultado en la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de un polipéptido o polinucleótido de origen natural. "Inserción" generalmente se refiere a la adición de uno o más residuos de aminoácidos dentro de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido (o residuos de nucleótidos dentro de un polinucleótido), mientras que "adición" puede ser una inserción o referirse a residuos de aminoácidos agregados en los terminales N o C de un polipéptido (o residuos de nucleótidos agregados en el extremo 5' o 3' de un polinucleótido). En el contexto de una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos, una inserción o adición puede ser de hasta 10, hasta 20, hasta 30 o hasta 50 o más aminoácidos (o residuos de nucleótidos).

- 35 Un plásmido, ácido nucleico, vector u otra sustancia "aislado" se refiere a una preparación de la sustancia desprovista de al menos algunos de los otros componentes presentes donde la sustancia o una sustancia similar ocurre naturalmente o a partir de la cual se prepara inicialmente. Así, por ejemplo, una sustancia aislada puede prepararse utilizando una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una mezcla fuente. El enriquecimiento se puede medir en términos absolutos, como el peso por volumen de solución, o se puede medir en relación con una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente. Los enriquecimientos crecientes de las realizaciones de esta invención se aíslan cada vez más. En algunas
- 40 realizaciones, un plásmido, ácido nucleico, vector u otra sustancia aislados se purifican, p. ej., desde aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % de pureza, al menos aproximadamente 90 % de pureza, al menos aproximadamente 95 % de pureza, al menos aproximadamente 98 % de pureza, o al menos aproximadamente 99 %, o más, de pureza.

- 45 Un "vector" es capaz de transferir secuencias de genes a células objetivo. Normalmente, "constructo vectorial", "vector de expresión" y "vector de transferencia de genes" significan cualquier constructo de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias de genes a células diana, lo que puede lograrse mediante la integración genómica de todo o una parte del vector, o el mantenimiento transitorio o hereditario del vector como un elemento extracromosómico. Por lo tanto, el término incluye la clonación y los vehículos de expresión, así como los vectores de integración.

- 50 El término "elemento regulador" tal como se utiliza en el presente documento incluye una secuencia de nucleótidos que controla algún aspecto de la expresión de secuencias de ácidos nucleicos. Los ejemplos de elementos reguladores incluyen, a modo ilustrativo, un potenciador, un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), un intrón, un origen de replicación, una señal de poliadenilación (pA), un promotor, un potenciador, una secuencia de terminación de la transcripción y un dominio regulador secuencia arriba, que contribuyen a la
- 55 replicación, transcripción y/o procesamiento postranscripcional de una secuencia de ácido nucleico. En algunos casos, los elementos reguladores también pueden incluir elementos de ADN reguladores en cis, así como elementos transponibles (TE). Los expertos en la materia son capaces de seleccionar y utilizar estos elementos reguladores en un constructo de expresión con sólo una experimentación de rutina. Los constructos de expresión se pueden generar utilizando un enfoque genético recombinante o sintéticamente utilizando una metodología bien conocida.
- 60

Un "elemento de control" o "secuencia de control" es una secuencia de nucleótidos involucrada en una interacción de moléculas que contribuyen a la regulación funcional de un polinucleótido, incluida la replicación, duplicación, transcripción, empalme, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso y puede ser de naturaleza potenciadora o inhibidora. Los elementos de control conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz, en determinadas condiciones, de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante normalmente ubicada más adelante (en la dirección 3') del promotor.

"Unido operativamente" u "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos, en donde los elementos están en una relación que les permite operar de la manera esperada. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una región codificante si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Puede haber residuos intermedios entre el promotor y la región codificante siempre que se mantenga esta relación funcional.

Los términos "cáncer", "neoplasia", "tumor" y "carcinoma" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a células que exhiben un crecimiento relativamente autónomo, de modo que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. Las células cancerosas pueden ser benignas o malignas. Los ejemplos de diversos tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

La frase "tumor homólogo" se refiere a cualquier tumor compuesto de tejido del mismo tipo a partir del cual se desarrolla. Además, un tumor puede ser homólogo a los TIL derivados de dicho tumor. Por ejemplo, un tumor de melanoma puede ser homólogo a los TIL derivados del tumor de melanoma y/o los TIL derivados de un tumor de melanoma pueden usarse para tratar el tumor de melanoma homólogo del cual se derivaron. En algunas realizaciones, los TILs derivados del tumor homólogo se pueden usar para tratar el tumor homólogo.

Por "individuo" o "huésped" o "sujeto" o "paciente" se entiende cualquier sujeto mamífero para quien se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia, en particular seres humanos. Otros sujetos pueden incluir ganado, perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones, caballos, etc.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aislado", cuando se emplea en el contexto de un compuesto aislado, se refiere a un compuesto de interés que se encuentra en un entorno diferente de aquel en donde el compuesto se encuentra naturalmente. "Aislado" pretende incluir compuestos que se encuentran dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas con el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés está parcial o sustancialmente purificado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustancialmente puro" se refiere a un compuesto que se extrae de su entorno natural y está al menos en un 60 % libre, 75 % libre o 90 % libre de otros componentes con los que está asociado naturalmente.

Se conocen en el arte técnicas para determinar la "identidad de secuencia" de ácidos nucleicos y aminoácidos. Normalmente, dichas técnicas incluyen la determinación de la secuencia de nucleótidos del ARNm de un gen y/o la determinación de la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo, y la comparación de estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. Se pueden comparar dos o más secuencias (polinucleótidos o aminoácidos) determinando su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. Una alineación aproximada de las secuencias de ácidos nucleicos es proporcionada por el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 2: 482-489 (1981). Este algoritmo se puede aplicar a secuencias de aminoácidos utilizando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, y normalizado por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763 (1986).

El Genetics Computer Group (Madison, WI) proporciona un ejemplo de una implementación de este algoritmo para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia en la aplicación de utilidad "BestFit". Los parámetros predeterminados para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, versión 8 (1995) (disponible a través de Genetics Computer Group, Madison, WI). Otro método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es utilizar el paquete de programas MPSRCH con derechos de autor de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). De este conjunto de paquetes, se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman donde se usan parámetros predeterminados para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de espacio de 12, penalización por extensión de

espacio de uno y un espacio de seis). A partir de los datos generados, el valor de "Coincidencia" refleja la "identidad de secuencia". En general, en la técnica se conocen otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, utilizado con parámetros predeterminados. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP se pueden utilizar usando los siguientes parámetros predeterminados: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; expectativa = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenado por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS del GenBank de Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la dirección de Internet que aparece colocando [http:// in front of blast.ncbi.nlm.nih.gov-Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov-Blast.cgi).

Alternativamente, en el contexto de los polinucleótidos, la homología se puede determinar mediante la hibridación de polinucleótidos en condiciones que formen dúplex estables entre regiones homólogas, seguida de digestión con nucleasa(s) monocatenaria(s) específica(s) y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

Dos secuencias de ADN o dos secuencias polipeptídicas son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando las secuencias exhiben al menos aproximadamente un 80 % - 85 %, al menos aproximadamente un 85 % - 90 %, al menos aproximadamente un 90 % - 95 % o al menos aproximadamente un 95 % - 98 % de identidad de secuencia a lo largo de una longitud definida de las moléculas, según se determina utilizando los métodos anteriores. Como se utiliza en el presente documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran una identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones estrictas, como las definidas para ese sistema en particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro del conocimiento de la técnica. Véase, p. ej., Sambrook and Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition*, (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Un primer polinucleótido se "deriva de" un segundo polinucleótido si tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos que una región del segundo polinucleótido, su ADNc, sus complementos, o si muestra identidad de secuencia como se describió anteriormente. Este término no pretende exigir ni implicar que el polinucleótido deba obtenerse del origen citado (aunque esto esté incluido), sino que puede obtenerse mediante cualquier método adecuado.

Un primer polipéptido (o péptido) se "deriva de" un segundo polipéptido (o péptido) si (i) está codificado por un primer polinucleótido derivado de un segundo polinucleótido, o (ii) muestra identidad de secuencia con los segundos polipéptidos como se describió anteriormente. Este término no pretende exigir o implicar que el polipéptido deba obtenerse del origen citado (aunque esto esté incluido), sino que puede elaborarse mediante cualquier método adecuado.

El término "en combinación con" como se utiliza en el presente documento se refiere a usos en los que, por ejemplo, una primera terapia se administra durante todo el curso de administración de una segunda terapia; donde la primera terapia se administra durante un período de tiempo que se superpone con la administración de la segunda terapia, por ejemplo, donde la administración de la primera terapia comienza antes de la administración de la segunda terapia y la administración de la primera terapia termina antes de que termine la administración de la segunda terapia; donde la administración de la segunda terapia comienza antes de la administración de la primera terapia y la administración de la segunda terapia termina antes de que termine la administración de la primera terapia; donde la administración de la primera terapia comienza antes de que comience la administración de la segunda terapia y la administración de la segunda terapia termina antes de que termine la administración de la primera terapia; donde la administración de la segunda terapia comienza antes de que comience la administración de la primera terapia y la administración de la primera terapia termina antes de que termine la administración de la segunda terapia. Como tal, "en combinación" también puede referirse a un régimen que implica la administración de dos o más terapias. "En combinación con" como se utiliza en el presente documento también se refiere a la administración de dos o más terapias que pueden administrarse en la misma o diferentes formulaciones, por la misma o diferentes vías y en el mismo o diferente tipo de forma de dosificación.

Los términos "tratamiento", "que trata", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a padecerla pero que aún no ha sido diagnosticado de padecerla; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo o progresión; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocando regresión de la enfermedad y/o aliviando uno o más síntomas de la enfermedad. El término "tratamiento" también incluye la administración de un agente con el fin de producir un efecto farmacológico, incluso en ausencia de una enfermedad o afección.

Por ejemplo, "tratamiento" abarca la administración de una composición que puede provocar una respuesta inmune o conferir inmunidad en ausencia de una enfermedad, p. ej., en el caso de una vacuna.

Las publicaciones discutidas en el presente documento se proporcionan para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente. En la medida en que dichas publicaciones puedan establecer una definición que entre en conflicto con una definición o divulgación explícita o implícita de la presente divulgación, prevalecerá la definición o divulgación de la presente divulgación.

Composiciones

- 10 Proteínas (por ejemplo, anticuerpos) que se unen específicamente a PD-L1

Se proporcionan proteínas (por ejemplo, anticuerpos) que se unen específicamente a PD-L1, ácidos nucleicos que codifican las proteínas y células que incluyen una proteína de la invención y/o un ácido nucleico que codifica una proteína de la invención. A lo largo de esta divulgación, una "proteína que se une específicamente a PD-L1" que incluye una región de unión a antígeno como se describe en el presente documento también se denomina "proteína de unión a PD-L1".

- 15 Se proporcionan dos nuevos anticuerpos recombinantes (denominados en el presente documento "38A1" y "19H9"), ambos de los cuales se unen específicamente al ligando de muerte programada 1 humano (PD-L1). El PD-L1 humana, número de acceso del NCBI NP_054862 (versión NP_054862.1 GL7661534), es una proteína de 290 aa que tiene la secuencia de aminoácidos (que incluye un péptido señal putativo en los aa 1-18 y un ectodominio en los aminoácidos 19-238):

```
MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVE
KQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKD
QLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY
NKNQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTT
TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPE
LPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGI
QDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 21)
```

PD-L1 también se conoce como CD274 y B7-H1, y se expresa en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula tumoral.

- 25 Los detalles de la secuencia, incluidas las secuencias de CDR e información adicional relacionada con los anticuerpos 38A1 y 19H9 se presentan en la Figura 7. Como tal, en algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 tiene una porción de unión a antígeno que incluye un primer polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 2-4 (CDR de cadena ligera L1, L2 y L3, respectivamente de scFV 38A1), y un segundo polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 6-8 (CDR de cadena pesada H1, H2 y H3, respectivamente de scFV 38A1). En algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 tiene una porción de unión a antígeno que incluye un primer polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 2-4 (CDR de cadena ligera L1, L2 y L3, respectivamente de scFV 38A1), y un segundo polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 6-8 (CDR de cadena pesada H1, H2 y H3, respectivamente de scFV 38A1).

- 35 En algunos casos, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1 (cadena ligera de 38A1) y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5 (cadena pesada de 38A1) (p. ej., véase la Figura 7). En algunos casos, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende las CDR enumeradas en las SEQ ID NOs: 2, 3 y 4 y en donde la proteína se une específicamente a PD-L1. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido comprende las CDR enumeradas en las SEQ ID NOs: 6, 7 y 8 y en donde la proteína se une específicamente a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9.
- 40 En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la

función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1.

Cadena ligera - Anticuerpo 38A1

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPAGIPERFSGSN
SGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 1)

5 CDR1(CDR-L1): NIGRKI (SEQ ID NO: 2)

CDR2(CDR-L2): YDT (SEQ ID NO: 3)

CDR3(CDR-L3): QVWDTGSDHVV (SEQ ID NO: 4)

Cadena pesada - Anticuerpo 38A1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVK
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWGQGTTVTVSA
(SEQ ID NO: 5)

10 CDR1(CDR-H1): GFTFSNYA (SEQ ID NO: 6)

CDR2(CDR-H2): ISGSGGTT (SEQ ID NO: 7)

CDR3(CDR-H3): AKDWFRSSSPDAFDI (SEQ ID NO: 8)

La capacidad de unión aumentada se puede medir (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). La capacidad de unión aumentada se puede medir (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3).

En algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 tiene una porción de unión a antígeno que incluye un primer polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 10-12 (CDR de cadena ligera L1, L2 y L3, respectivamente de scFV 19H9), y un segundo polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 14-16 (CDR de cadena pesada H1, H2 y H3, respectivamente de scFV 19H9). En algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 tiene una porción de unión a antígeno que incluye un primer polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 10-12 (CDR de cadena ligera L1, L2 y L3, respectivamente de scFV 19H9), y un segundo polipéptido que incluye las 3 secuencias de aminoácidos de CDR establecidas en las SEQ ID NOs: 14-16 (CDR de cadena pesada H1, H2 y H3, respectivamente de scFV 19H9). En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende las CDR enumeradas en las SEQ ID NOs: 10, 11 y 12 y en donde la proteína se une específicamente a PD-L1. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido comprende las CDR enumeradas en las SEQ ID NOs: 14, 15 y 16 y en donde la proteína se une específicamente a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1.

Cadena ligera - Anticuerpo 19H9

NFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQRPSGVSDRFSG
SIGSSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTVL
(SEQ ID NO: 9)

CDR1(CDR-L1): SGSIARKF (SEQ ID NO: 10)

CDR2(CDR-L2): ENN (SEQ ID NO: 11)

CDR3(CDR-L3): QSYDSSNVV (SEQ ID NO: 12)

Cadena pesada - Anticuerpo 19H9

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKG
RFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYCVRRERVEREYSGYDAFDIWGGQTTVTVSA

5 (SEQ ID NO: 13)

CDR1(CDR-H1): GFTFSSYS (SEQ ID NO: 14)

CDR2(CDR-H2): INTAGDT (SEQ ID NO: 15)

CDR3(CDR-H3): VRERVEREYSGYDAFDI (SEQ ID NO: 16)

10 En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9 (cadena ligera de 19H9), y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13 (cadena pesada de 19H9) (p. ej., véase la Figura 7). En algunos casos, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13.

15 En algunas realizaciones, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 es un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) (discutido anteriormente). Como tal, en algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 es un scFv, y el primer y segundo polipéptidos de la porción de unión al antígeno, como se describió anteriormente (p. ej., en esta sección), están fusionados entre sí (y por lo tanto son parte del mismo polipéptido). Los ejemplos de scFv adecuados incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en las SEQ ID NOs: 17 y 19 (véase la Figura 7). En algunos casos, el primer y segundo polipéptido de un scFv se separan uno del otro a través de un enlazador (p. ej., un enlazador flexible). Una persona con conocimientos normales en la materia conocerá varios enlazadores y se puede utilizar cualquier enlazador conveniente. Un enlazador flexible puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos para una región de bisagra derivada de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un enlazador flexible se puede colocar, por ejemplo, entre una porción de unión a antígeno (un dominio de unión a antígeno) de un anticuerpo (p. ej., un scFv) y un dominio Fc de inmunoglobulina. En la técnica se conocen diversos enlazadores flexibles, incluidos, por ejemplo, enlazadores flexibles que incluyen uno o más aminoácidos Gly, Ser, Asn y/o Asp. En algunas realizaciones, el enlazador flexible es GGGGS. En algunas realizaciones, el enlazador flexible es (GGGGS)*n* (SEQ ID NO: 35), en donde *n* es un número entero entre 1 y 10. En algunas realizaciones, el enlazador flexible es GGGGS. En algunas realizaciones, el enlazador flexible es GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, el enlazador flexible es GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37). En algunas realizaciones, el enlazador flexible es GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 38). En algunas realizaciones, el enlazador flexible es GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 39). En algunas realizaciones, el enlazador flexible comprende un Ala y Pro (AP) en el terminal C. En algunas realizaciones, el enlazador flexible es GGGSGG GSGGGSGAP (SEQ ID NO: 40).

35 Los enlazadores flexibles de los scFv de las SEQ ID NOs: 17 y 19 están en negrita y subrayados en la Figura 7. En algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más de identidad de secuencia (p. ej., 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOs: 17 y 19 (por ejemplo, ver Figura 7).

40 En algunas realizaciones, el scFv comprende la siguiente secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGS
GGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPD
AFDIWGGQTTVTVSAGGGSGGGSGGGSGGSGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARIT
CGGNINIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTDRPAGIPERFSGSNSGNMATLTIST
VGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 17).

En algunas realizaciones, el scFv comprende la siguiente secuencia:

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGINT
 AGDTHYPESVKGRFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYCVRRERVEREYSG
 YDAFDIWGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPNFMILTQPHSVSESLGKTV
 TISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQRPSGVSDRFSGSIGSSNSAS
 LTISGLKTEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTVL

(SEQ ID NO: 19).

- 5 En algunas realizaciones, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 (p. ej., un scFv) se fusiona directamente o a través de un enlazador a un dominio Fc (o un fragmento del mismo) (p. ej., un Fc IgG1, un Fc IgG2, un Fc IgG3, un Fc IgG4 o un fragmento del mismo) para proporcionar un maxicuerpo. En algunos casos, el Fc es un dominio Fc de IgG1. En algunos casos, un dominio Fc de IgG1 tiene la secuencia:

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMetISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWY
 VDGVVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMetTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMetHEALH
 NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:22)

En algunas realizaciones, el Fc es un dominio Fc de IgG4. En algunos casos, un dominio Fc de IgG4 tiene la secuencia:

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMetISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWY
 VDGVVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMetTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMetHEALH
 10 NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:23)

- 15 En algunas realizaciones, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 es un anticuerpo humanizado. En algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 es un scFv (p. ej., como se describió anteriormente) fusionado a un dominio Fc (o un fragmento del mismo) (p. ej., un Fc de IgG1, un Fc de IgG2, un Fc de IgG3, un Fc de IgG4 o un fragmento del mismo). En algunos casos, una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más de identidad de secuencia (p. ej., 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más, o 100 % de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 18 y 20 (p. ej., véase la Figura 7).

En algunas realizaciones, la proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 comprende:

MGSTAILALLAVLQGVSAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS
 WVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRV
 EDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPS
 YVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPA
 GIPERFSGSNSGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL
 GPRANFVYKSGPRPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPET
 20 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
 (SEQ ID NO: 18).

En algunas realizaciones, la proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 comprende:

MGSTAILALLLAVLQGVSAQVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMN
WVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKGRFTISRDNARNSLNLQMNSLRAE
DTAVYYCVRERVEREYSGYDAFDIWGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGA
PNFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQ
RPSGVSDRFGSIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTV
LGPRANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 20).

Una proteína de unión a PD-L1 de la invención (p. ej., un scFV) se puede fusionar con un compañero de fusión. Ejemplos de compañeros de fusión para una proteína de unión a PD-L1 de la invención (p. ej., scFV) incluyen, pero no se limitan a: (a) un ligando para un receptor de activación de NK (por ejemplo, ectodominio ULBP1),

5

Las secuencias de ejemplo de los compañeros de fusión anteriores son las siguientes, e incluyen proteínas de cremallera de leucina autodimerizantes, dominios CD4 humanos 3 y 4 (3/4) y péptido del terminal carboxilo (CTP) de gonadotropina coriónica humana (hCG).

10

En algunas realizaciones, la proteína de cremallera de leucina autodimerizante comprende:

RSGSSRMetKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERTSSRG (SEQ ID NO: 24)

En algunas realizaciones, los dominios CD4 humanos 3 y 4 (3/4) comprenden

ASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKEVS
VKRVTQDPKLQMetGKKLPLHLTPQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKLGHEVNLV
VMetRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMetLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAG
MetWQCLLSDSGQVLLESNIKVL (SEQ ID NO:25)

15

En algunas realizaciones, el péptido del terminal carboxilo (CTP) de la gonadotropina coriónica humana (hCG) comprende:

SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 26)

Propiedades de la proteína de unión a PD-L1 & composiciones conjuntas

20

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 100 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 90 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 80 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 70 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 60 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 50 pM o menos,

25

se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 40 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 30 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 20 pM o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 10 pM o menos, o se une a PD-1 humana con una K_D de aproximadamente 1 pM o menos.

30

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a PD-1 humana con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 7.5×10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 8×10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 8.5×10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 9×10^5 1/M·s o más rápido, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 9.5×10^5 1/M·s o más rápido, o se une a PD-1 humana con una $k_{\text{asociación}}$ de aproximadamente 1×10^6 1/M·s o más rápido.

35

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con un K_D de aproximadamente 2.1×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.2×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.3×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.4×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.5×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.6×10^{-5} 1/s o más lento o se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.7×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.8×10^{-5} 1/s o más lento, se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 2.9×10^{-5} 1/s o más lento, o se une a PD-1 humana con una $k_{\text{disociación}}$ de aproximadamente 3×10^{-5} 1/s o más lento.

En algunas realizaciones, las composiciones y métodos descritos incluyen un inhibidor de PD-1 que bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 10 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 9 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 8 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 7 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 6 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 5 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 4 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 3 nM o menos, bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 2 nM o menos, o bloquea o inhibe la unión de PD-L1 humana o PD-L2 humana a PD-1 humana con una IC_{50} de aproximadamente 1 nM o menos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo PD-L1. En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-L1 es un anticuerpo de alta afinidad. En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-L1 es un anticuerpo PD-L1 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-L1 es un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-L1 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-L1 se une a PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-8} M o menos, se une a PD-1 humana con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, o se une a PD-1 humana con una K_D de entre 1×10^{-8} M y 1×10^{-10} M. En algunas realizaciones, el anticuerpo PD-L1 se une a PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos.

Ácidos nucleicos que codifican una proteína de la invención

Ácidos nucleicos y vectores

Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una proteína de la invención (que se une específicamente a PD-L1). Una proteína de la invención puede estar codificada por uno o más ácidos nucleicos. Por ejemplo, en los casos en que el primer y el segundo polipéptido de la porción de unión al antígeno son polipéptidos separados (es decir, no están fusionados entre sí), el primer y el segundo polipéptido pueden codificarse en el mismo ácido nucleico o en ácidos nucleicos diferentes. En algunas realizaciones, los uno o más ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión a PD-L1 de la invención (p. ej., anticuerpo, scFv, un maxicuerpo, etc.) se incluyen en un vector de expresión. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en el mismo vector. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en vectores diferentes. En algunas realizaciones, el primer polipéptido está codificado en un primer vector. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido está codificado en un segundo vector. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pL V4301G PDL V scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral codifica la proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1

obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugada a una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugada a una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Los vectores derivados de retrovirus como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja adicional sobre los vectores derivados de oncoretrovirus, como los virus de la leucemia murina, de que pueden transducir células no proliferantes, como los hepatocitos. También tienen la ventaja adicional de una baja inmunogenicidad.

El vector de expresión puede proporcionarse a una célula (p. ej., introducido en una célula) en forma de vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado

contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables.

Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la materia. El virus recombinante puede luego aislarse y administrarse a las células deseadas.

La presente divulgación también proporciona vectores de expresión en los que se inserta un constructo de ácido nucleico de la presente divulgación. En algunas realizaciones, se puede utilizar un sistema de expresión inducible. Cuando se desea una expresión inducible, se encuentran disponibles varios vectores que facilitan dicha expresión inducible, incluidos, pero no se limitan a, vectores inducibles por tetraciclina y análogos de tetraciclina, vectores inducibles por tamoxifeno, así como otros vectores de sistemas de transcripción inducibles conocidos en la técnica.

El constructo de ácido nucleico puede estar unido operativamente a elementos de control que dirigen su transcripción o expresión en la secuencia de nucleótidos *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado (p. ej., elementos de control celular endógenos). Alternativamente, se pueden emplear secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles generalmente incluyen aquellas derivadas de secuencias que codifican genes de mamíferos o virales. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano de SV40, el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus del tumor mamario de ratón; el promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus del herpes simple (HSV), un promotor celular endógeno heterólogo al gen de interés, un promotor del citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata del CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores sintéticos, promotores híbridos y similares. Además, también se pueden utilizar secuencias derivadas de genes no virales, como el gen de la metalotioneína murina. Estas secuencias promotoras están disponibles comercialmente en, p. ej., Stratagene (San Diego, California).

En algunas realizaciones, un promotor específico de un tipo de célula o de un tejido se puede unir operativamente a un inserto de ácido nucleico que codifica el producto génico heterólogo, y permitir la producción selectiva o preferencial de un producto génico en un tipo(s) de célula(s) o tejido(s) particular(es), por ejemplo, la expresión en linfocitos citotóxicos. En algunas realizaciones, un promotor inducible puede unirse operativamente al ácido nucleico heterólogo.

Los vectores divulgados en el presente documento también pueden incluir elementos de control convencionales unidos operativamente al inserto de ácido nucleico (también denominado secuencia de nucleótidos heteróloga) de una manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con el vector producido de acuerdo con la presente invención. Como se utiliza en el presente documento, las secuencias "operativamente enlazadas" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de expresión que actúan *en trans* o a distancia para controlar el gen de interés.

Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales de procesamiento eficiente del ARN, como señales de empalme y poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que mejoran la secreción del producto codificado. En la técnica se conocen un gran número de secuencias de control de expresión, incluidos promotores seleccionados entre nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejido, y pueden utilizarse.

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor del virus de células murinas (MSCV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV) (véase, por ejemplo, Boshart et al., Cell, 41: 521-530 (1985)), el promotor de SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa, el promotor de la beta-actina, el promotor de la fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor de EF1 (Invitrogen). Los promotores inducibles permiten regular la expresión de los genes y pueden regularse mediante compuestos suministrados exógenamente, factores ambientales como la temperatura o la presencia de un estado fisiológico específico, p. ej., fase aguda, un estado particular de diferenciación de la célula, o sólo en células en replicación. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles a través de una variedad de fuentes comerciales, incluidas, entre otras, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y una persona experta en la materia puede seleccionarlos fácilmente. Los ejemplos de promotores inducibles regulados por compuestos suministrados exógenamente incluyen el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de la polimerasa T7 (Documento WO 98/10088); el promotor de insectos ecdisona (No et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 93: 3346-3351), el sistema

reprimible por tetraciclina (Gossen et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 89: 5547-5551), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., (1995) Science, 268: 1766-1769, véase también Harvey et al., (1998) Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512-518), el sistema inducible por RU486 (Wang et al., (1997) Nat. Biotech., 15: 239-243 y Wang et al., (1997) Gene Ther., 4: 432-441) y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., (1997) J. Clin. Invest., 100: 2865-2872). Otros tipos de promotores inducibles útiles en este contexto son aquellos regulados por un estado fisiológico específico, p. ej., temperatura, fase aguda, un estado particular de diferenciación de la célula o únicamente en células en replicación. En algunas realizaciones, se utiliza un vector lentiviral que contiene un promotor de virus de células murinas (MSCV) o un promotor de factor de elongación humano-1 alfa (EF-1 alfa) para expresar un ácido nucleico que codifica una proteína de unión a PD-L1 de la invención como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento.

En otra realización, se utilizará el promotor nativo para el inserto de ácido nucleico. El promotor nativo puede ser preferido cuando se desea que la expresión del inserto de ácido nucleico imite la expresión nativa. El promotor nativo se puede utilizar cuando la expresión del inserto de ácido nucleico debe regularse temporalmente o durante el desarrollo, o de manera específica del tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, también se pueden utilizar otros elementos de control de expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak para imitar la expresión nativa.

Otra realización del ácido nucleico incluye un gen unido operativamente a un promotor específico de tejido. Por ejemplo, si se desea la expresión en células T y/o linfocitos citotóxicos, se debe emplear un promotor activo en células T y/o linfocitos citotóxicos.

En diversas realizaciones, el vector que porta uno o más insertos de ácido nucleico también incluye marcadores seleccionables o genes reporteros, p. ej., secuencias que codifican resistencia a la geneticina, higromicina o puromicina, pero no se limitan a. Se pueden utilizar reporteros seleccionables o genes marcadores para señalar la presencia de plásmidos/vectores en células bacterianas, incluido, por ejemplo, el examen de la resistencia a la ampicilina. Otros componentes del plásmido pueden incluir un origen de replicación. La selección de estos y otros promotores y elementos vectoriales es convencional y muchas de estas secuencias están disponibles (véase, p. ej., Sambrook et al., y las referencias citadas en el mismo).

En algunos casos, un ácido nucleico de la invención incluye un promotor que está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a PD-L1 de la invención. Los promotores adecuados incluyen promotores constitutivos (p. ej., promotor de CMV, promotor de EF1alfa, MSCV y similares), así como promotores inducibles (p. ej., promotores inducibles por tetraciclina y análogos de tetraciclina, promotores inducibles por tamoxifeno y similares) y promotores condicionales como el promotor de NR4A1. En algunas realizaciones, el vector comprende transposones.

En algunas realizaciones, el vector es pLEV que tiene una secuencia de nucleótidos como la proporcionada en la Figura 10. En algunas realizaciones, el vector pLEV que contiene la proteína de unión a PD-L1 se proporciona en la Figura 11. En algunas realizaciones, el vector es la SEQ ID NO: 41 (Figura 11A). En algunas realizaciones, el vector es la SEQ ID NO: 42 (Figura 11B). En algunas realizaciones, el vector es el vector que se muestra en la Figura 16A. En algunas realizaciones, el vector se muestra en la Figura 16B.

En algunas realizaciones, el vector es un vector retroviral, tal como un vector gammaretroviral.

En algunos casos, un ácido nucleico de la invención que codifica una proteína de unión a PD-L1 se incluye en un plásmido, p. ej., para la expresión transitoria en una célula eucariota, para la integración genómica de un casete de expresión (que incluye la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a PD-L1 unida operativamente a un promotor) en una célula eucariota, para la propagación en una célula bacteriana y similares.

Células

La presente divulgación proporciona células que incluyen una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1, y/o incluyen un ácido nucleico (p. ej., como se discutió anteriormente) que codifica la proteína. Para las células que incluyen un ácido nucleico que codifica una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1, el ácido nucleico se puede mantener episomalmente (p. ej., puede ser un plásmido) o el ácido nucleico puede integrarse en el genoma. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en el mismo ácido nucleico. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en diferentes ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el primer polipéptido está codificado en un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido está codificado en un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector

viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de

unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En la invención, la célula es un linfocito citotóxico, específicamente un TIL. En algunas realizaciones, la célula es un linfocito citotóxico y puede denominarse un linfocito citotóxico modificado genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión al ligando de muerte programada 1 (PD-L1) soluble. En tales casos, el término "genéticamente modificado" abarca escenarios en los que el ácido nucleico se mantiene episomalmente, así como escenarios en los que el ácido nucleico se integra en el genoma de la célula. En algunos casos, la célula es un linfocito citotóxico que está modificado genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión al ligando de muerte programada 1 (PD-L1) soluble, donde la modificación genética es una modificación del genoma (es decir, un ácido nucleico que codifica una proteína de la invención se integra en el genoma de la célula).

Linfocitos citotóxicos que pueden modificarse genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, incluyen células T citotóxicas (CTL), células T asesinas naturales (NKT) y células asesinas naturales (NK). Los linfocitos citotóxicos de la presente invención son linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En algunas realizaciones, el linfocito citotóxico se ha modificado para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 seleccionada del grupo que consiste en 38A1 y 19H9. En algunas realizaciones, el linfocito citotóxico se ha modificado para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, el linfocito citotóxico se ha modificado para expresar y secretar 19H9.

Una célula T citotóxica de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T CD8⁺. Una célula T citotóxica de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T colaboradora CD4⁺. Una célula T citotóxica de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T CD8⁺ modificada para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 como se describe en el presente documento. Una célula T citotóxica de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T colaboradora CD4⁺ modificada para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 como se describe en el presente documento. Una célula T citotóxica de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T CD8⁺ modificada para expresar y secretar 38A1. Una célula T citotóxica de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T colaboradora CD4⁺ modificada para expresar y secretar 19H9. Una célula T de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T CD8⁺ modificada para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. Una célula T citotóxica de acuerdo con la presente divulgación puede ser una célula T colaboradora CD4⁺ modificada para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID

NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Un linfocito citotóxico que puede modificarse genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, puede expresar uno o más antígenos de activación. Por ejemplo, un linfocito citotóxico de acuerdo con la presente divulgación puede exhibir un mayor nivel de expresión de uno o más antígenos de activación en relación con una célula T no modificada. El o los antígenos de activación pueden seleccionarse entre, p. ej., CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT y HLA-DR. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-

L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, un linfocito citotóxico que puede modificarse genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 de la invención como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, incluye o está modificado genéticamente para incluir un receptor específico para un antígeno asociado a un tumor, p. ej., un antígeno asociado a un tumor de un sujeto que se va a tratar con un linfocito citotóxico modificado genéticamente de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID

NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Un linfocito citotóxico que puede modificarse genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, puede obtenerse de cualquier tejido o fluido adecuado de un sujeto. Por ejemplo, un linfocito citotóxico puede obtenerse de la sangre periférica de un sujeto. En algunas realizaciones, un linfocito citotóxico que puede modificarse genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 de la invención como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, es un TIL derivado de un tumor de un sujeto. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera

comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Etiquetas detectables

Una proteína de la invención que se une específicamente a PD-L1 (es decir, una proteína de unión a PD-L1 de la invención) como se describe en el presente documento, por ejemplo, en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, puede incluir una o más etiquetas detectables. En la técnica se conocen diversas etiquetas detectables adecuadas, entre las que se incluyen, entre otras, isótopos radiactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromóforos, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (p. ej., biotina, avidina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término "fluorescente" se refiere a una sustancia o una porción de la misma que es capaz de exhibir fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables adecuadas para su uso como componentes de las proteínas de unión a PD-L1 incluyen etiquetas de afinidad y proteínas fluorescentes (p. ej., GFP, YFP, RFP, CFP y similares). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas

realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

El término "etiqueta de afinidad" se utiliza en el presente documento para indicar un segmento de péptido, p. ej., un segmento peptídico heterólogo que puede incorporarse a una proteína de unión a PD-L1 de un sujeto y detectarse utilizando una molécula que se une a la etiqueta de afinidad y proporciona una señal detectable (p. ej., un compuesto o proteína fluorescente). En principio, cualquier péptido o proteína para el que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico se puede utilizar como etiqueta de afinidad. Los ejemplos de etiquetas de afinidad adecuadas para su uso incluyen, pero no se limitan a, un péptido de unión a la proteína adaptadora monocítica (MONA), un péptido de unión a T7, un péptido de unión a estreptavidina, un tracto de polihistidina, proteína A (Nilsson et al., EMBO J. 4: 1075 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol. 198: 3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith and Johnson, Gene 67: 31 (1988)), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82: 7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp et al., Biotechnology 6: 1204 (1988)), u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95 (1991). Las moléculas de ADN que codifican etiquetas de afinidad están disponibles a través de proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida

con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Cualquier polipéptido fluorescente (también denominado en el presente documento como etiqueta fluorescente) bien conocido en la técnica es adecuado para su uso como etiqueta detectable directamente o en conexión con una etiqueta de afinidad. Un polipéptido fluorescente adecuado será uno que pueda expresarse en una célula T huésped deseada, como una célula bacteriana o una célula de mamífero, y proporcionará fácilmente una señal detectable que pueda evaluarse cualitativamente (positiva/negativa) y cuantitativamente (p. ej., grado comparativo de fluorescencia). Los ejemplos de polipéptidos fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), GFP, mRFP, RFP (tdimer2), HCRED, etc., o cualquier mutante (p. ej., proteínas fluorescentes modificadas para proporcionar una fluorescencia mejorada o un espectro de emisión desplazado), análogo o derivado de las mismas. En la técnica se proporcionan otros polipéptidos fluorescentes adecuados, así como ejemplos específicos de los enumerados en el presente documento, y son bien conocidos. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o

comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Las etiquetas basadas en biotina también pueden encontrar utilidad en las proteínas de unión a PD-L1 divulgadas en el presente documento. La biotilación de moléculas y sustratos es bien conocida, por ejemplo, se conocen una gran cantidad de agentes de biotilación, incluidos agentes reactivos con aminas y reactivos con tiol, para la biotilación de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos carboxílicos; véase, p. ej., Capítulo 4, Molecular Probes Catalog, Haugland, 6th Ed. 1996. Un sustrato biotilado se puede detectar mediante la unión de un compañero de unión a biotina marcado de manera detectable, como avidina o estreptavidina. Del mismo modo, también se conocen un gran número de reactivos de haptenilación. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada

con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Métodos

Transferencia de células adoptivas

La transferencia de células adoptivas (ACT) es una forma muy eficaz de inmunoterapia e implica la transferencia de células inmunes con actividad antitumoral a pacientes con cáncer. ACT es un enfoque de tratamiento que implica la identificación, *in vitro*, de linfocitos con actividad antitumoral, la expansión *in vitro* de estas células en grandes cantidades y su infusión en el huésped portador del cáncer. Los linfocitos utilizados para la transferencia adoptiva pueden derivarse del estroma de tumores resecados (linfocitos infiltrantes de tumores o TIL). También pueden derivarse de la sangre si se modifican genéticamente para expresar receptores de células T antitumorales (TCR) o receptores de antígenos quiméricos (CAR), se enriquecen con cultivos de células tumorales de linfocitos mixtos (MLTC) o se clonan utilizando células presentadoras de antígenos autólogas y péptidos derivados de tumores. La ACT en donde los linfocitos se originan en el huésped portador del cáncer que se va a infundir se denomina ACT autóloga. La publicación de los Estados Unidos No.

2011/0052530 se refiere a un método para realizar una terapia celular adoptiva para promover la regresión del cáncer, principalmente para el tratamiento de pacientes que padecen melanoma metastásico.

En la presente invención, los linfocitos citotóxicos son TIL. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos pueden proporcionarse para su administración en una sola dosis. Dicha administración podrá realizarse mediante inyección, p. ej., inyección intravenosa. En algunas realizaciones, se pueden proporcionar TIL y/o linfocitos citotóxicos para administración en múltiples dosis. La dosis puede ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de seis veces al año. La dosificación puede ser una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana o una vez cada dos días. Se podrán seguir administrando TIL y/o linfocitos citotóxicos durante el tiempo que sea necesario.

En algunas realizaciones, una dosis efectiva de TIL y/o linfocitos citotóxicos es de aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 2×10^6 , aproximadamente 3×10^6 , aproximadamente 4×10^6 , aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 6×10^6 , aproximadamente 7×10^6 , aproximadamente 8×10^6 alrededor de 9×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 2×10^7 , aproximadamente 3×10^7 , aproximadamente 4×10^7 , aproximadamente 5×10^7 , aproximadamente 6×10^7 , aproximadamente 7×10^7 , aproximadamente 8×10^7 alrededor de 9×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 2×10^8 , aproximadamente 3×10^8 , aproximadamente 4×10^8 , aproximadamente 5×10^8 , aproximadamente 6×10^8 , aproximadamente 7×10^8 , aproximadamente 8×10^8 , aproximadamente 9×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 2×10^9 , aproximadamente 3×10^9 , aproximadamente 4×10^9 , aproximadamente 5×10^9 , aproximadamente 6×10^9 , aproximadamente 7×10^9 , aproximadamente 8×10^9 , aproximadamente 9×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 2×10^{10} , aproximadamente 3×10^{10} , aproximadamente 4×10^{10} , aproximadamente 5×10^{10} , aproximadamente 6×10^{10} , aproximadamente 7×10^{10} , aproximadamente 8×10^{10} , aproximadamente 9×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 2×10^{11} , aproximadamente 3×10^{11} , aproximadamente 4×10^{11} , aproximadamente 5×10^{11} , aproximadamente 6×10^{11} , aproximadamente 7×10^{11} , aproximadamente 8×10^{11} , aproximadamente 9×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 2×10^{12} , aproximadamente 3×10^{12} , aproximadamente 4×10^{12} , aproximadamente 5×10^{12} , aproximadamente 6×10^{12} , aproximadamente 7×10^{12} , aproximadamente 8×10^{12} , aproximadamente 9×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 2×10^{13} , aproximadamente 3×10^{13} , aproximadamente 4×10^{13} , aproximadamente 5×10^{13} , aproximadamente 6×10^{13} , aproximadamente 7×10^{13} , aproximadamente 8×10^{13} y aproximadamente 9×10^{13} . En algunas realizaciones, una dosis efectiva de TIL y/o linfocitos citotóxicos está en el intervalo de aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 5×10^6 hasta aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^7 hasta aproximadamente 5×10^7 , aproximadamente 5×10^7 hasta aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^8 hasta aproximadamente 5×10^8 , aproximadamente 5×10^8 hasta aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^9 hasta aproximadamente 5×10^9 , aproximadamente 5×10^9 hasta aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{10} hasta aproximadamente 5×10^{10} , aproximadamente 5×10^{10} hasta aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 5×10^{11} hasta aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{12} hasta aproximadamente 5×10^{12} , y aproximadamente 5×10^{12} hasta aproximadamente 1×10^{13} . En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9 o 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9 a partir de pLV4301GPDV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1 de pLV4301GPDV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector lentiviral para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas

realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en diferentes vectores o ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Poner en contacto las células con una proteína de la invención

Se proporcionan métodos para reducir la interacción entre PD-L1 en una primera célula (p. ej., una célula cancerosa tal como una célula tumoral) y PD-1 en otra célula (p. ej., una célula inmune tal como una célula T). Dichos métodos pueden incluir poner en contacto PD-L1 en la primera célula con una proteína de unión a PD-L1 de la invención (p. ej., anticuerpo anti-PD-L1, scFV anti-PD-L1, maxicuerpo anti-PD-L1, etc.). Cualquier cantidad de reducción puede ser útil en algunos casos (dependiendo del contexto). En algunos casos, la interacción entre PD-L1 y PD-1 se reduce en un 10 % o más (por ejemplo, 20 % o más, 30 % o más, 50 % o más, 60 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, o 100 %). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo

de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Se puede utilizar cualquier ensayo conveniente para medir la cantidad de reducción y dichos ensayos serán conocidos por una persona con conocimientos ordinarios en la materia. Ejemplos de ensayos para medir la cantidad de reducción (p. ej., donde los ensayos se pueden realizar en presencia o ausencia de una proteína de unión a PD-L1 de la invención, como un anticuerpo anti-PD-L1, scFV anti-PD-L1, maxicuerpo anti-PD-L1 y similares) pueden incluir, pero no se limitan a: medir la inhibición de la producción de citocinas en ensayos de reacción de linfocitos mixtos (ensayos MLR, p. ej., ensayos MLR alo), medir las interacciones entre los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y un tumor homólogo, medir la citotoxicidad (p. ej., ensayos de citotoxicidad, como ensayos para medir la actividad de las células T citotóxicas hacia una célula que expresa PD-L1, tal como una célula cancerosa), medir la translocación de NFkB al núcleo y medir la actividad/salida de señalización de la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR (p. ej., véase Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9): 846-56).

El contacto puede tener lugar *in vivo*. En algunos casos, el contacto incluye la introducción en una célula (p. ej., la célula que expresa PD-L1, la célula que expresa PD-1 o una tercera célula) un ácido nucleico que codifica una proteína de unión a PD-L1 de la invención, y la célula en donde se introduce el ácido nucleico produce y secreta la proteína de unión a PD-L1. En los casos en que el ácido nucleico se introduce en una tercera célula, esta puede utilizarse para proporcionar la proteína de unión a PD-L1 mediante secreción. En algunas

realizaciones, cuando el ácido nucleico se introduce en una tercera célula, la tercera célula puede usarse luego para proporcionar al individuo o sujeto que lo necesita la proteína de unión a PD-L1 mediante secreción. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Las formulaciones terapéuticas que comprenden una o más proteínas de unión a PD-L1 de la divulgación se pueden preparar para su almacenamiento mezclando la proteína de unión a PD-L1 que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's

Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. La composición de la proteína de unión a PD-L1 se puede formular, dosificar y administrar de un modo coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores para tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" de la proteína de unión a PD-L1 que se va a administrar puede regirse por dichas consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para tratar la enfermedad del paciente (p. ej., cáncer, infección crónica). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv)

que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

La dosis terapéutica puede ser de al menos 0.01 mg/kg de peso corporal, al menos 0.05 mg/kg de peso corporal; al menos 0.1 mg/kg de peso corporal, al menos 0.5 mg/kg de peso corporal, al menos 1 mg/kg de peso corporal, al menos 2 mg/kg de peso corporal, al menos 2.5 mg/kg de peso corporal, al menos 5 mg/kg de peso corporal, al menos 7.5 mg/kg de peso corporal, al menos 10 mg/kg de peso corporal, al menos 15 mg/kg de peso corporal, al menos 20 mg/kg de peso corporal, al menos 25 mg/kg de peso corporal, al menos 30 mg/kg de peso corporal, al menos 35 mg/kg de peso corporal, al menos 40 mg/kg de peso corporal, al menos 45 mg/kg de peso corporal, al menos 50 mg/kg de peso corporal, al menos 55 mg/kg de peso corporal, al menos 60 mg/kg de peso corporal, al menos 65 mg/kg de peso corporal, al menos 70 mg/kg de peso corporal, al menos 75 mg/kg de peso corporal, al menos 80 mg/kg de peso corporal, al menos 85 mg/kg de peso corporal, al menos 90 mg/kg de peso corporal, al menos 95 mg/kg de peso corporal, al menos 100 mg/kg de peso corporal, al menos 110 mg/kg de peso corporal, al menos 120 mg/kg de peso corporal, al menos 130 mg/kg de peso corporal, al menos 140 mg/kg de peso corporal, al menos 150 mg/kg de peso corporal, al menos 160 mg/kg de peso corporal, al menos 170 mg/kg de peso corporal, al menos 180 mg/kg de peso corporal, al menos 190 mg/kg de peso corporal, al menos 200 mg/kg de peso corporal, al menos 210 mg/kg de peso corporal, al menos 220 mg/kg de peso corporal, al menos 230 mg/kg de peso corporal, al menos 240 mg/kg de peso corporal, al menos 250 mg/kg de peso corporal, al menos 260 mg/kg de peso corporal, al menos 270 mg/kg de peso corporal, al menos 280 mg/kg de peso corporal, al menos 290 mg/kg de peso corporal, al menos 300 mg/kg de peso corporal, al menos 310 mg/kg de peso corporal, al menos 320 mg/kg de peso corporal, al menos 330 mg/kg de peso corporal, al menos 340 mg/kg de peso corporal, al menos 350 mg/kg de peso corporal, al menos 360 mg/kg de peso corporal, al menos 370 mg/kg de peso corporal, al menos 380 mg/kg de peso corporal, al menos 390 mg/kg de peso corporal, al menos 400 mg/kg de peso corporal, al menos 410 mg/kg de peso corporal, al menos 420 mg/kg de peso corporal, al menos 430 mg/kg de peso corporal, al menos 440 mg/kg de peso corporal, al menos 450 mg/kg de peso corporal, al menos 460 mg/kg de peso corporal, al menos 470 mg/kg de peso corporal, al menos 480 mg/kg de peso corporal, al menos 490 mg/kg de peso corporal y al menos 500 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis no es más de 500 mg/kg de peso corporal. Un experto en la materia entenderá que dichas pautas se ajustarán al peso molecular del agente activo, p. ej., en el uso de fragmentos de anticuerpos, o en el uso de conjugados de anticuerpos. La dosis también puede variarse para la administración localizada, p. ej., intranasal, inhalación, etc., o para administración sistémica, p. ej., im, ip, iv y similares. En algunas realizaciones, el anticuerpo para administración es 19H9 o 38A1, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo para administración es 19H9. En algunas realizaciones, se administra una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo para administración es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv)

que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

La proteína de unión a PD-L1 no necesita estar, pero opcionalmente está formulada con uno o más agentes que potencian la actividad o que de otro modo aumentan el efecto terapéutico. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con las mismas vías de administración que las utilizadas anterior o aproximadamente entre el 1 y el 99 % de las dosis empleadas hasta ahora. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones que se van a utilizar para administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ

ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada de la proteína de unión a PD-L1 puede depender del tipo de enfermedad a tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si la proteína de unión a PD-L1 se administra con fines preventivos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la proteína de unión a PD-L1, y la discreción del médico tratante. La proteína de unión a PD-L1 se puede administrar al paciente en una sola dosis o durante una serie de tratamientos. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ

ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Métodos de transferencia celular adoptiva con linfocitos citotóxicos modificados genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión al ligando de muerte programada 1 (PD-L1) soluble

Linfocitos citotóxicos que expresan y secretan una proteína de unión a PD-L1 como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, encuentran uso en métodos de transferencia de células adoptivas, p. ej., en el contexto del tratamiento del cáncer o de una infección crónica.

En algunas realizaciones, los métodos adecuados de acuerdo con la presente divulgación incluyen, por ejemplo, aislar linfocitos citotóxicos, específicamente TIL, como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, de un sujeto, p. ej., de un tumor.

En algunas realizaciones, los métodos adecuados de acuerdo con la presente divulgación incluyen, por ejemplo, modificar genéticamente los linfocitos citotóxicos introduciendo en los linfocitos citotóxicos un ácido nucleico que codifica una proteína de unión a PD-L1 de la invención como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, en donde los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente expresan y secretan la proteína de unión a PD-L1 de la invención como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3).. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID

NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, los métodos adecuados de acuerdo con la presente divulgación incluyen, por ejemplo, expandir el linfocito citotóxico modificado genéticamente, específicamente TIL, para proporcionar una población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9 o 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9 a partir de pLV4301GPDV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1 de pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector lentiviral para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en diferentes vectores o ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo

que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una

5 cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID

10 NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, los métodos adecuados de acuerdo con la presente divulgación incluyen, por ejemplo, proporcionar la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente para su administración al sujeto para tratar una enfermedad o trastorno del sujeto, p. ej., un cáncer o una infección crónica. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9 o 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9 a partir de pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1 de pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector lentiviral para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad

de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en diferentes vectores o ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector o ácido nucleico. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Aislamiento de linfocitos citotóxicos de un sujeto

Se conocen muchos métodos adecuados en la técnica para aislar linfocitos citotóxicos de un sujeto, p. ej., un sujeto humano, y se puede utilizar cualquier método conveniente. Por ejemplo, los linfocitos infiltrantes de tumores como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, se pueden aislar a partir de muestras frescas de biopsia de pacientes. Alternativamente, los linfocitos citotóxicos pueden obtenerse de la sangre periférica de un sujeto. Los métodos descritos en el presente documento se describen principalmente en el contexto de los linfocitos citotóxicos autólogos utilizados para ACT.

Modificación genética de los linfocitos citotóxicos

Modificar genéticamente los linfocitos citotóxicos para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1 como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, puede incluir la introducción en los linfocitos citotóxicos de un ácido nucleico que codifica una proteína de unión a PD-L1 de la invención. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende un primer y un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en el mismo vector. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en vectores diferentes. En algunas realizaciones, el primer polipéptido está codificado en un primer vector. En la técnica se conocen muchas formas de lograr esto y se puede utilizar cualquier método conveniente (p. ej., utilizando cualquier vector o combinación de vectores conveniente, p. ej., un vector retroviral, p. ej., un vector lentiviral, un vector adenoviral u otros vectores, p. ej., junto con plásmidos de envoltura y empaquetamiento adecuados). Elementos reguladores de los vectores lentivirales, p. ej., los promotores pueden seleccionarse específicamente para una expresión estable en linfocitos citotóxicos. Véase, p. ej., Jones et al., Hum. Gene Ther. 2009 Jun; 20(6): 630-640, que describe el uso de un vector lentiviral que contiene un promotor del virus de células murinas (MSCV) para su uso con linfocitos mínimamente estimulados y altamente activados. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por el vector es 38A1 o 19H9. En algunas

realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por el vector es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por el vector es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por el vector comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por uno o más vectores es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 codificada por uno o más vectores es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por uno o más vectores es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 codificada por uno o más vectores es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugada con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, el gen de la proteína de unión a PD-L1 de la invención puede ser parte de un casete de expresión génica más grande introducido en los linfocitos citotóxicos que permite una expresión inducible de la proteína de unión a PD-L1 de la invención, p. ej., utilizando un fármaco permeable a la membrana celular que activa los elementos promotores que impulsan el gen PD-L1 de la invención. La retirada del fármaco detendría la expresión genética, lo que permitiría una expresión regulable activada/desactivada de la proteína de unión a PD-L1 de la invención. Hay varios vectores disponibles que facilitan esta expresión inducible, incluidos, pero no se limitan a, vectores inducibles por tetraciclina y análogos de tetraciclina, vectores inducibles por tamoxifeno, así como otros vectores de sistemas de transcripción inducibles conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de

unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Un esquema de un ejemplo de un vector de expresión (p. ej., un lentivector) que codifica un promotor inducible se proporciona en la Figura 8. El diseño básico incluye dos promotores. Un promotor es constitutivamente activo e impulsa la transcripción de un factor de transcripción conformacional (CTF) que cambia de conformación al unirse a una molécula soluble (SM). El segundo promotor se une al CTF e impulsa el gen de interés. Hay dos posibilidades. En ambos casos, la unión del CTF a su promotor media la transcripción. En el primer caso, la adición del SM libera el CTF del promotor inducible, deteniendo la transcripción. En el segundo caso, la adición de SM induce la unión del CTF al promotor inducible y el inicio de la transcripción.

Un esquema de otro ejemplo de un vector de expresión (p. ej., lentivector) se proporciona en la Figura 9, que representa esquemáticamente un vector de expresión inhibible que codifica una proteína represora conformacional. El diseño básico incluye dos promotores. Ambos promotores son constitutivamente activos. Uno impulsa la transcripción de una proteína represora conformacional (CRP) que cambia de conformación al unirse a una molécula soluble (SM). La CRP se une a un sitio de unión de CRP (CRP-BS) e inhibe la transcripción del segundo promotor constitutivo que impulsa la transcripción del gen de interés. La adición de la molécula soluble libera la CRP de la CRP-BS "liberando" la transcripción del gen de interés.

La Figura 16 proporciona esquemas adicionales de vectores virales ejemplares para usar con los métodos actuales, incluidos pLV4301G PDLV scFV 38A1 y pLV4301G PDLV scFV 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO 38; Figura 11B, Figura 16B).

La molécula soluble utilizada como se describió anteriormente con los vectores de expresión inducibles puede ser cualquier molécula adecuada conocida en la técnica para su uso con dichos vectores de expresión inducibles, p. ej., tetraciclina (o análogos de la misma) o tamoxifeno. Dichas moléculas solubles pueden administrarse a un sujeto de acuerdo con uno o más de los métodos descritos en el presente documento, p. ej., antes, simultánea o posteriormente a la administración de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente

como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, a un sujeto. Alternativamente, o, además, se pueden utilizar vectores de expresión que incluyan elementos que respondan a condiciones y/o moléculas presentes en un sitio de acción deseado en un sujeto, p. ej., un microambiente tumoral. Por ejemplo, se pueden utilizar vectores de expresión que incluyan un elemento de respuesta a la hipoxia para inducir selectivamente la expresión en el microambiente hipóxico de un tumor sólido. Véase, p. ej., Wang et al.. Cancer Center Gene Ther. 2005 Mar; 12(3): 276-83.

Se pueden utilizar métodos de transfección adicionales, que pueden incluir métodos virales y no virales, según sea apropiado para introducir ácidos nucleicos que codifican proteínas de unión a PD-L1 de la invención en linfocitos citotóxicos. Los métodos que pueden utilizarse para facilitar la administración a los linfocitos citotóxicos pueden incluir, p. ej., electroporación, bombardeo de partículas (pistola genética), sonoporación, magnetofección, administración hidrodinámica, administración de nanopartículas, lipofección, etc. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada es 38A1 o 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada es 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada es 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por uno o más vectores es un anticuerpo o fragmento del mismo, en donde la cadena ligera está codificada por un primer vector y la cadena pesada está codificada por un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por uno o más vectores es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 codificada por uno o más vectores es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena

ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

10 Producción viral

En algunas realizaciones, el vector viral para la transfección se produce utilizando cualquier método bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En

algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha

5 cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la

10 proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugada con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la

15 proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-

20 L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-

25 L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, el vector viral se produce para la transfección utilizando un método que comprende sembrar 5×10^6 células fénix en una placa de cultivo de tejido de 10 mm que contiene 5 mL de medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, el virus se produce para la transfección utilizando un método que comprende

30 además transfectar células con 10 μ g de pLEV (vector lentiviral) que contiene scFV anti-PD-1 y 6 μ g de pVSV-G utilizando lipofectamina. En algunas realizaciones, el virus se produce para la transfección utilizando un método que comprende además recolectar el sobrenadante y filtrarlo con un filtro de 70 μ m en un tubo de 15 mL después de 60 minutos. En algunas realizaciones, el virus se produce para la transfección utilizando un

35 método que comprende las siguientes etapas: 1) sembrar en placa 5×10^6 células fénix en una placa de cultivo de tejido de 10 mm que contiene 5 mL de medio de cultivo celular; 2) transfectar las células con 10 μ g de pLEV (vector lentiviral) que contiene scFV anti-PD-1 y 6 μ g de pVSV-G usando lipofectamina; y 3) después de 60 horas, recolectar el sobrenadante y filtrar con un filtro de 70 μ m en un tubo de 15 mL.

Transducción de células T

En la presente invención, los linfocitos citotóxicos son TIL. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos (es decir, los TIL) se transducen con el vector viral (es decir, modificados genéticamente con el vector viral). En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A).

45 En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector

50 viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV que codifica una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas

55 realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión

60 a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo

utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, las células T se transducen utilizando un método que comprende la activación de 1×10^6 TIL con anti-CD3 a una concentración de 300 ng/mL en 2 mL de medio de cultivo TIL en placa de 12 pocillos. En algunas realizaciones, el método de transducción comprende además dividir el TIL en dos pocillos y agregar 1 mL de sobrenadante (de la etapa 3 en la producción viral) en cada pocillo junto con polibreno a una concentración de 8 µg/mL después de 48 horas. En algunas realizaciones, el método de transducción comprende además centrifugar las células durante 30 minutos a 800 X g a 32 °C. En algunas realizaciones, el método de transducción comprende además eliminar el medio que contiene el virus y resuspender el sedimento celular con 2 mL de medio de cultivo completo fresco e incubar las células durante 24 horas. En algunas realizaciones, el método de transducción comprende además la propagación de las células utilizando la expansión de linfocitos citotóxicos genéticamente modificados que se proporciona a continuación, así como

cualquier otro método conocido en la técnica para expandir TIL que podría aplicarse para expandir linfocitos citotóxicos dentro de la población de TIL.

Muestras de tumores

- En la presente invención, los linfocitos citotóxicos son TIL. En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra de tejido tumoral obtenida del mamífero, en donde la muestra tumoral comprende TIL que contienen los linfocitos citotóxicos. La muestra de tejido tumoral se puede obtener de numerosas fuentes, incluidas, entre otras, la biopsia o la necropsia del tumor. La muestra de tejido tumoral puede obtenerse de cualquier cáncer, incluidos, pero no se limitan a, cualquiera de los cánceres descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. La muestra de tejido tumoral puede obtenerse de cualquier mamífero. En algunas realizaciones, la muestra de tejido tumoral se obtiene de un ser humano. En algunas realizaciones, la muestra de tejido tumoral puede ser un fragmento de tejido tumoral. La muestra de tejido tumoral puede estar fragmentada, p. ej., mediante disección, para proporcionar un fragmento de tejido tumoral. En algunas realizaciones, de forma alternativa o adicional, la muestra de tejido tumoral puede, opcionalmente, digerirse enzimática o mecánicamente. Las enzimas adecuadas para fragmentar la muestra de tejido tumoral incluyen, entre otras, la colagenasa. En algunas realizaciones, la muestra de tejido tumoral se fragmenta sin digestión. El fragmento de tejido tumoral puede tener cualquier tamaño adecuado. Preferiblemente, el fragmento de tejido tumoral tiene un tamaño de aproximadamente 1 mm³ o menos hasta aproximadamente 8 mm³ o más grande, aproximadamente 1 mm³ hasta aproximadamente 4 mm³, hasta aproximadamente 1 mm³ hasta aproximadamente 2 mm³, o aproximadamente 1 mm³.
- El cáncer tratado mediante las composiciones y métodos divulgados puede, en algunos aspectos, ser cualquier tumor sólido para el cual se pueden producir TIL. El cáncer también puede ser metastásico y/o recurrente. El cáncer puede ser cualquier cáncer, incluido cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer del ano, del canal anal o del anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, vesícula biliar o la pleura, cáncer de la nariz, cavidad nasal o del oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer del tracto digestivo, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, cáncer hepatobiliar, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma metastásico.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluidos, pero no se limitan a, los mamíferos del orden Rodentia, tal como ratones y hámsteres, y los mamíferos del orden Logomorpha, tal como los conejos. Se prefiere que los mamíferos sean del orden Carnivora, incluidos los felinos (gatos) y los caninos (perros). Es más preferible que los mamíferos sean del orden Artiodactyla, incluidos bovinos (vacas) y cerdos (puercos) o del orden Perssodactyla, incluidos equinos (caballos). Lo más preferible es que los mamíferos sean del orden Primates, Ceboidea o Simioides (monos) o del orden Antropoides (humanos y simios). En algunas realizaciones, el mamífero es el ser humano.

Métodos generales de expansión de linfocitos citotóxicos que contienen TIL

- La producción de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que contienen linfocitos citotóxicos es generalmente un proceso de dos etapas: 1) la etapa previa a REP (expansión rápida), donde se cultivan las células en medios de laboratorio estándar como RPMI y se tratan los TIL con reactivos como células alimentadoras irradiadas y anticuerpos anti-CD3 para lograr el efecto deseado; y 2) la etapa REP, donde se expanden los linfocitos citotóxicos que contienen TIL en una cantidad de cultivo lo suficientemente grande para tratar a los pacientes. La etapa REP requiere reactivos de grado cGMP (procedimientos actuales de buena fabricación) y 30-40 L de medio de cultivo. Sin embargo, la etapa previa a REP puede utilizar reactivos de grado de laboratorio (bajo el supuesto de que los reactivos de grado de laboratorio se diluyan durante la etapa REP), lo que facilita la incorporación de estrategias alternativas para mejorar la producción de TIL. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el agonista de TLR y/o péptido o peptidomiméticos divulgados se pueden incluir en el medio de cultivo durante la etapa previa a REP. El cultivo previo a REP puede, en algunas realizaciones, incluir IL-2.
- En algunas realizaciones, la ACT se puede realizar (i) proporcionando TIL autólogo que contiene linfocitos citotóxicos obtenidos de un mamífero, (ii) cultivando (incluyendo, por ejemplo, REP) el TIL autólogo que contiene linfocitos citotóxicos para producir linfocitos expandidos, y (ii) proporcionando el TIL expandido que contiene linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL son derivados de tumores, es decir, son TIL que contienen citotóxicos y se aíslan del mamífero a tratar, es decir transferencia autóloga. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos autólogos que contienen TIL son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones,

los linfocitos citotóxicos autólogos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los linfocitos autólogos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente utilizando un vector viral. En algunas realizaciones, los linfocitos autólogos se modifican genéticamente antes o después del cultivo, pero antes de proporcionar su administración al mamífero. En algunas realizaciones, los

5 linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pL V4301G PDL V scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el

10 vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral

15 es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas

20 realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas

25 realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación

30 con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o

35 comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las

40 células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas

45 realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un

50 anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una

60 cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv

65

de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, la ACT autóloga como se describe en el presente documento también se puede realizar (i) cultivando TIL autólogo que contiene linfocitos citotóxicos para producir linfocitos expandidos; (ii) proporcionando opcionalmente quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa para administración al mamífero; y (iii) después de proporcionar opcionalmente quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa para administración, proporcionando los linfocitos citotóxicos que contienen TIL expandidos para administración al mamífero. Los TIL autólogos pueden obtenerse del estroma de tumores resecados. Para ello se obtienen muestras de tumores de los pacientes y se obtiene una suspensión de células individuales. La suspensión de células individuales se puede obtener de cualquier manera adecuada, p. ej., mecánicamente (desagregando el tumor mediante, p. ej., un disociador gentleMACS™, Miltenyi Biotec, Auburn, California) o enzimáticamente (p. ej., colagenasa o DNasa). En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos autólogos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los linfocitos autólogos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente utilizando un vector viral. En algunas realizaciones, los linfocitos autólogos se modifican genéticamente antes o después del cultivo, pero antes de proporcionar su administración al mamífero. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas

realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

La expansión de linfocitos, incluidos los linfocitos que se infiltran en tumores, como las células T, se puede lograr mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluidos los que se describen a continuación. Por ejemplo, las células T se pueden expandir rápidamente utilizando la estimulación del receptor de células T no específico en presencia de linfocitos alimentadores e interleucina-2 (IL-2), IL-7, IL-15, IL-21 o combinaciones de las mismas. El estímulo no específico del receptor de células T puede p. ej., incluir alrededor de 30 ng/mL de OKT3, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 (disponible a través de Ortho-McNeilTM, Raritan, N.J. o Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Como alternativa, las células T se pueden expandir rápidamente mediante la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) *in vitro* con uno o más antígenos (incluidas porciones antigénicas de los mismos, tal como epítopo(s), o una célula del cáncer, que se puede expresar opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), p. ej., aproximadamente 0.3 μ M de MART-1:26-35 (27 L) o gp100:209-217 (210 M)), en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como alrededor de 200-400 μ L/mL, tal como 300 UI/mL de IL-2 o IL-15, siendo preferida la IL-2. Las células T inducidas *in vitro* se expanden rápidamente mediante la reestimulación con el mismo antígeno(s) del cáncer pulsado a las células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A2. Alternativamente, las células T pueden reestimularse con linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2, por ejemplo. Véase, por ejemplo, la publicación internacional de patentes WO 2015/143328.

La reactividad tumoral específica de los TIL expandidos se puede probar mediante cualquier método conocido en la técnica, p. ej., midiendo la liberación de citocinas (p. ej., interferón-gamma) después del cocultivo con células tumorales. En una realización, el método ACT autólogo comprende enriquecer TIL cultivados para células T CD8+ antes de la expansión rápida de las células. Después del cultivo de los TIL en IL-2, las células T se despojan de células CD4+ y se enriquecen con células CD8+ utilizando, por ejemplo, una separación de CD8 con micropelotas (p. ej., utilizando un sistema de micropelotas para CD8 CliniMACS<plus> (Miltenyi Biotec)). En algunas realizaciones, se proporciona un factor de crecimiento de células T que promueve el crecimiento y la activación de las células T autólogas para su administración al mamífero ya sea concomitantemente con las

células T autólogas o posteriormente a las células T autólogas. El factor de crecimiento de células T puede ser cualquier factor de crecimiento adecuado que promueva el crecimiento y la activación de las células T autólogas. Los ejemplos de factores de crecimiento de células T adecuados incluyen interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15, IL-12 e IL-21, que pueden usarse solos o en varias combinaciones, como IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, IL-7 e IL-15, IL-2, IL-7 e IL-15, IL-12 e IL-7, IL-12 e IL-15, o IL-12 e IL-2. En algunas realizaciones, se puede emplear la mejora de la coestimulación 4-1BB para aumentar la expansión activa de TIL para la terapia celular adoptiva.

Expansión de los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente

Expandir los linfocitos citotóxicos que contienen TIL y/o expandir (es decir, REP) los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente para proporcionar una población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente incluyen el cultivo de los linfocitos citotóxicos que contienen TIL ex vivo para proporcionar una población de linfocitos citotóxicos que contienen TIL, p. ej., para reintroducir en el sujeto (incluyendo, por ejemplo, un mamífero). En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se cultivan en medios adecuados que contienen células mononucleares de sangre periférica irradiadas (PBMC) (células alimentadoras), aisladas por leucaféresis del sujeto o de donantes alogénicos, y reactivos adecuados tales como interleucina 2 (IL-2), p. ej., IL-2 humana y OKT3 (anticuerpo anti-CD3). Como alternativa al uso de PBMC, se podrían utilizar células presentadoras de antígenos artificiales en la expansión de linfocitos citotóxicos, p. ej., células K562 modificadas genéticamente para expresar los receptores Fc humano CD32 y CD64, de modo que las células K562 pueden unirse y presentar anticuerpos monoclonales α CD3 y α CD28. Tales células presentadoras de antígenos artificiales, incluidas las células presentadoras de antígenos artificiales que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras, se describen, por ejemplo, en Turtle and Riddell Cancer J. 2010 Jul-Aug; 16(4): 374-381.

Como parte de la etapa de expansión o como una etapa(s) adicional(es), se pueden realizar una o más etapas de selección para enriquecer los TIL y/o los linfocitos citotóxicos de interés (p. ej., linfocitos citotóxicos que expresan receptores para uno o más antígenos asociados a tumores), p. ej., mediante uno o más ensayos inmunológicos.

Además de TIL, también se pueden obtener linfocitos citotóxicos, macrófagos, monocitos y células asesinas naturales (NK) de la muestra de tejido tumoral, cultivarlos y expandirlos como se describe en el presente documento para TIL. En consecuencia, el método también puede comprender proporcionar macrófagos, monocitos y células asesinas naturales (NK) para su administración al mamífero. En algunas realizaciones, los métodos se pueden emplear para expandir linfocitos citotóxicos, por ejemplo, incluyendo etapa(s) de expansión de REP.

Después de obtener una muestra de tumor que comprende linfocitos citotóxicos que contienen TIL, se expanden los TIL y/o los linfocitos citotóxicos. En algunas realizaciones, el método de propagación de los linfocitos citotóxicos que contienen TIL y/o linfocitos citotóxicos modificados genéticamente comprende (i) cultivar (es decir, previo a REP) los linfocitos citotóxicos que contienen TIL, incluido el uso de IL-2; (ii) expansión (es decir, REP) los linfocitos citotóxicos cultivados utilizando el anticuerpo OKT3, IL-2 y linfocitos alimentadores, en donde los linfocitos citotóxicos cultivados se enriquecen con células T CD8+ antes de la expansión de los linfocitos citotóxicos; (iii) proporcionar opcionalmente quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa para administración al mamífero; y (iv) después de proporcionar opcionalmente la administración de quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa para administración al mamífero, proporcionar para la administración al mamífero los linfocitos citotóxicos expandidos, en donde los linfocitos citotóxicos proporcionados para la administración al mamífero tienen de aproximadamente 19 a aproximadamente 35 días de antigüedad y no han sido examinados para determinar la reactividad tumoral específica, con lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos proporcionados para administración tienen menos de aproximadamente 35 días de antigüedad, p. ej., de aproximadamente 19 a aproximadamente 26 días de antigüedad. Véase, por ejemplo, los métodos descritos en la patente de los Estados Unidos No. 8,383,099, así como los métodos proporcionados en el presente documento.

En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente después de obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después de cultivar los linfocitos citotóxicos que contienen TIL. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después de expandir los linfocitos citotóxicos cultivados utilizando el anticuerpo OKT3, IL-2 y linfocitos alimentadores, en donde los linfocitos citotóxicos cultivados se enriquecen con células T CD8+ antes de la expansión de los TIL y/o los linfocitos citotóxicos. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes de proporcionar su administración al mamífero. Los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente utilizando un vector viral. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en el mismo vector. En algunas realizaciones, el primer y segundo polipéptidos están codificados en vectores diferentes. En algunas realizaciones, el primer polipéptido está codificado en un primer vector. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido está codificado en un segundo vector. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es

pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ

ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, se cree que los linfocitos citotóxicos que tienen aproximadamente 19 a aproximadamente 35 días de antigüedad proporcionan una proliferación, supervivencia y actividad antitumoral *in vivo* mejoradas en comparación con los linfocitos citotóxicos que tienen aproximadamente 44 días de antigüedad o más. Además, en ejemplos que incluyen quimioterapia no mieloablativa, los métodos inventivos se pueden utilizar de manera ventajosa para tratar pacientes que no serían elegibles para tratamientos que involucran irradiación corporal total (TBI), como, por ejemplo, pacientes que ya se han sometido a terapia mieloablativa p. ej., radioterapia, antes del tratamiento; pacientes con condiciones comórbidas; y pacientes con menos de 2×10^6 células CD34⁺/kg.

En algunas realizaciones, el período de tiempo requerido para generar linfocitos citotóxicos para la terapia celular adoptiva (ACT) puede acortarse de un promedio de aproximadamente 44 días a un intervalo de aproximadamente 19 a aproximadamente 35 días (o menos de aproximadamente 35 días, p. ej., aproximadamente 19 a aproximadamente 29 días, o aproximadamente 19 a aproximadamente 26 días). En consecuencia, se podría tratar a más pacientes antes de que su carga de enfermedad progrese a una etapa en donde la administración de ACT ya no sea segura o posible. En algunas realizaciones, los métodos no requieren probar *in vitro* la reactividad de antígenos específicos antes de proporcionar los linfocitos citotóxicos para su administración, los métodos inventivos reducen el tiempo, los gastos y el trabajo asociados con el tratamiento de los pacientes. Además, los métodos inventivos pueden emplear la provisión de administración de linfocitos citotóxicos que se agrupan a partir de cultivos a granel en lugar de aquellos derivados de microcultivos.

Una realización del método comprende el cultivo de linfocitos citotóxicos autólogos. Se obtienen muestras de tumores de los pacientes y se obtiene una suspensión de células individuales. La suspensión de células individuales se puede obtener de cualquier manera adecuada, p. ej., mecánicamente (desagregando el tumor mediante, p. ej., un disociador gentleMACS™, Miltenyi Biotec, Auburn, California) o enzimáticamente (p. ej., colagenasa o DNasa). Las suspensiones de células individuales de digeridos enzimáticos tumorales se cultivan en interleucina-2 (IL-2), p. ej., en varios pocillos. Las células se cultivan hasta la confluencia (p. ej., aproximadamente 2×10^6 linfocitos), p. ej., de aproximadamente 5 a aproximadamente 21 días, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días. Por ejemplo, las células pueden cultivarse desde 5 días, 5.5 días o 5.8 días hasta 21 días, 21.5 días o 21.8 días, preferiblemente desde 10 días, 10.5 días o 10.8 días hasta 14 días, 14.5 días o 14.8 días.

En algunas realizaciones, el método comprende expandir linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados. Los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados se agrupan y se expanden rápidamente. La expansión rápida proporciona un aumento en el número de células T específicas del antígeno de al menos aproximadamente 50 veces (p. ej., 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces, o más) durante un período de aproximadamente 10 días a aproximadamente 14 días y, en algunas realizaciones, aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, la expansión rápida proporciona un aumento de al menos aproximadamente 200 veces (por ejemplo, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces o más) durante un período de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días, en algunas realizaciones, aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, la expansión rápida proporciona un aumento de al menos aproximadamente 1000 veces durante un período de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días, en algunas realizaciones, aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, la expansión rápida proporciona un aumento de aproximadamente 1000 veces durante un período de aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados están modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados se modifican genéticamente utilizando un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9.

En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

La expansión se puede lograr mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los linfocitos citotóxicos pueden expandirse rápidamente utilizando la estimulación del receptor de células T no específico en presencia de linfocitos alimentadores y ya sea interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15), siendo preferida la IL-2. El estímulo del receptor de células T no específico puede incluir alrededor de 30 ng/mL de OKT3, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 (disponible a través de Ortho-McNeilTM,

Raritan, N.J.). Como alternativa, los linfocitos citotóxicos se pueden expandir rápidamente mediante la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) *in vitro* con uno o más antígenos (incluidas porciones antigénicas de los mismos, tal como epítipo(s) o una célula) del cáncer, que se pueden expresar opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), p. ej., 0.3 μ M MART-1:26-35 (27 L) o gp100:209-217 (210 M), en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como 300 UI/mL de IL-2 o IL-15. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento de células T es IL-2. Los linfocitos citotóxicos inducidos *in vitro* se expanden rápidamente mediante la reestimulación con el mismo(s) antígeno(s) del cáncer aplicados a las células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A2. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos pueden reestimularse con linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2, por ejemplo.

En algunas realizaciones, se proporciona un factor de crecimiento de células T que promueve el crecimiento y la activación de los TIL y/o linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero ya sea concomitantemente con el TIL o posteriormente al TIL. El factor de crecimiento de células T puede ser cualquier factor de crecimiento adecuado que promueva el crecimiento y la activación de los TIL. Los ejemplos de factores de crecimiento de células T adecuados incluyen interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 e IL-12, que pueden usarse solos o en varias combinaciones, tal como IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, IL-7 e IL-15, IL-2, IL-7 e IL-15, IL-12 e IL-7, IL-12 e IL-15, o IL-12 e IL-2. IL-2 es un factor de crecimiento de células T preferido.

En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican aún más para expresar un factor de crecimiento de células T que promueve el crecimiento y la activación de los TIL y/o los linfocitos citotóxicos. Los factores de crecimiento de células T adecuados incluyen, por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente. Se conocen en la técnica métodos adecuados de modificación. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos modificados expresan el factor de crecimiento de células T en niveles altos. Las secuencias codificantes del factor de crecimiento de células T, tal como la de IL-12, están fácilmente disponibles en la técnica, al igual que los promotores, cuyo enlace operativo a una secuencia codificante del factor de crecimiento de células T promueve una expresión de alto nivel. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos pueden modificarse para expresar IL-12 como se describe en la publicación de la solicitud de patente de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual No. WO 2010/126766.

En algunas realizaciones, dos citocinas pueden ser más eficaces que una sola citocina y, en algunas realizaciones, tres citocinas, p. ej., IL-2, IL-7 e IL-15, pueden ser más eficaces que dos citocinas cualesquiera. Se cree que la IL-15 mejora la expresión de células T CD8⁺ específicas del tumor. En este sentido, la administración de células cultivadas con IL-15 con IL-2 (tal como mediante una inyección en bolo) puede ser especialmente eficaz. En algunas realizaciones, se pueden proporcionar TIL y/o linfocitos citotóxicos modificados para expresar IL-15 para administración con IL-2 como una inyección en bolo.

El factor de crecimiento de células T se puede administrar mediante cualquier vía adecuada. En realizaciones en las que se proporciona más de un factor de crecimiento de células T para administración, se pueden proporcionar para administración simultánea o secuencialmente, en cualquier orden y por la misma vía o por vías diferentes. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento de células T, tal como IL-2, se proporciona para administración por vía intravenosa como una inyección en bolo. En algunas realizaciones, la dosis del factor de crecimiento de células T, tal como IL-2, es lo que los expertos en la materia consideran alto. En algunas realizaciones, se proporciona una dosis de aproximadamente 720,000 UI/kg de IL-2 para administración tres veces al día hasta tolerancia, particularmente cuando el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, se proporcionan para administración aproximadamente de 5 a aproximadamente 15 dosis de IL-2, con un promedio de alrededor de 8 dosis.

Los TIL y/o linfocitos citotóxicos pueden reconocer cualquiera de los antígenos únicos producidos como resultado de las aproximadamente 10,000 mutaciones genéticas codificadas por cada genoma de célula tumoral. Sin embargo, el antígeno no necesita ser único. Los TIL y/o los linfocitos citotóxicos pueden reconocer uno o más antígenos de un cáncer, incluida una porción antigénica de uno o más antígenos, tal como un epítipo, o una célula del cáncer. Un "antígeno de un cáncer" y un "antígeno del cáncer" pretenden abarcar todos los antígenos mencionados anteriormente. Si el cáncer es un melanoma, tal como un melanoma metastásico, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos pueden reconocer MART-1 (tal como MART-1:26-35 (27L)), gp100 (como gp100:209-217 (210M)) o un antígeno "único" o específico del paciente derivado de una mutación codificada por el tumor. Otros antígenos de melanoma adecuados que pueden ser reconocidos por TIL pueden incluir, pero no se limitan a, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa (TRP)1, TRP2 y MAGE. TIL también puede reconocer antígenos como, por ejemplo, NY-ESO-1, telomerasa, p53, HER2/neu, antígeno carcinoembrionario o antígeno específico de próstata, para el tratamiento de carcinoma de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata y similares.

En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar opcionalmente la administración al mamífero de quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa. La quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa puede ser

- cualquier terapia adecuada, que puede administrarse por cualquier vía adecuada. La quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa puede comprender, por ejemplo, la administración de ciclofosfamida y fludarabina, particularmente si el cáncer es melanoma, que puede ser metastásico. En algunas realizaciones, la vía de administración de ciclofosfamida y fludarabina es intravenosa. Asimismo, se puede administrar cualquier dosis adecuada de ciclofosfamida y fludarabina. En algunas realizaciones, se proporcionan alrededor de 60 mg/kg de ciclofosfamida para administración durante dos días, después de los cuales se administran alrededor de 25 mg/m² durante cinco días. En algunas realizaciones, se proporcionan alrededor de 60 mg/kg de ciclofosfamida para administración durante dos días, después de los cuales se administran alrededor de 25 mg/m² de fludarabina para administración durante cinco días y el cáncer/tumor es melanoma.
- En algunas realizaciones, el método comprende, después de proporcionar opcionalmente para la administración la quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa, proporcionar para la administración al mamífero los linfocitos citotóxicos expandidos, en donde los linfocitos citotóxicos proporcionados para la administración al mamífero tienen de aproximadamente 19 a aproximadamente 35 días de antigüedad. Por ejemplo, los linfocitos citotóxicos para administración pueden tener entre 19 días, 19.5 días o 19.8 días a 35 días, 35.5 días o 35.8 días de antigüedad. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos para administración al mamífero tienen una antigüedad de aproximadamente 19 días a aproximadamente 29 días o de aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días, o de aproximadamente 26 días. Por ejemplo, los linfocitos citotóxicos para administración pueden tener de 19 días, 19.5 días o 19.8 días a 29, 29.5 o 29.8 días de antigüedad; de 23, 23.5 o 23.8 a 29, 29.5 o 29.8 días de antigüedad; o de 26, 26.5 o 26.8 días de antigüedad. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que se proporcionan para administración al mamífero son linfocitos citotóxicos "jóvenes", es decir, linfocitos citotóxicos mínimamente cultivados o linfocitos citotóxicos de entre 19 días a aproximadamente 29 días o de aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días de antigüedad, o de aproximadamente 26 días de antigüedad.
- Los cultivos de linfocitos citotóxicos jóvenes que se proporcionan para administración al mamífero de acuerdo con una realización de la invención tienen ventajosamente características asociadas con persistencia, proliferación y actividad antitumoral *in vivo*. Por ejemplo, los cultivos de linfocitos citotóxicos jóvenes tienen una mayor expresión de CD27 y/o CD28 que los linfocitos citotóxicos que tienen aproximadamente 44 días de antigüedad. Sin estar atado a una teoría en particular, se cree que CD27 y CD28 están asociados con la proliferación, persistencia *in vivo* y un estado menos diferenciado de los linfocitos citotóxicos (sin limitarse a la teoría, se cree que la mayor diferenciación de los linfocitos citotóxicos afecta negativamente la capacidad de los linfocitos citotóxicos para funcionar *in vivo*). Se cree que los linfocitos citotóxicos que expresan niveles más elevados de CD27 tienen una mejor actividad antitumoral que las células con bajo contenido de CD27. Además, los cultivos de linfocitos citotóxicos jóvenes (p. ej., de 19 días a aproximadamente 29 días o de aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días de antigüedad, o aproximadamente 26 días de antigüedad) tienen una frecuencia más alta de células CD4⁺ que los linfocitos citotóxicos que tienen aproximadamente de 44 días de antigüedad.
- Además, los cultivos de linfocitos citotóxicos jóvenes tienen una longitud media de telómero mayor que la de los linfocitos citotóxicos que tienen aproximadamente 44 días de antigüedad. Sin estar atado a una teoría en particular, se cree que los linfocitos citotóxicos pierden una longitud estimada de telómero de 0.8 kb por semana en cultivo, y que los cultivos de linfocitos citotóxicos jóvenes tienen telómeros que son aproximadamente 1.4 kb más largos que los linfocitos citotóxicos que tienen aproximadamente 44 días de antigüedad. Sin estar limitado a una teoría en particular, se cree que las longitudes de telómeros más largas están asociadas con respuestas clínicas objetivas positivas en los sujetos y la persistencia de las células *in vivo*.
- En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos no se analizan para determinar su reactividad tumoral específica para identificar linfocitos citotóxicos reactivos tumorales antes de proporcionar su administración al paciente. La reactividad tumoral específica se puede probar mediante cualquier método conocido en la técnica, p. ej., midiendo la liberación de citocinas (p. ej., interferón- γ) después del cocultivo con células tumorales. Los métodos inventivos permiten ventajosamente promover la regresión del cáncer en un mamífero proporcionando linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero sin la necesidad de una evaluación previa para el reconocimiento de un tumor específico. Las realizaciones de los métodos pueden, si se desea, incluir la prueba de la potencia de los linfocitos citotóxicos de una manera no específica del antígeno antes de proporcionar los linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero. En algunas realizaciones, se puede probar opcionalmente la potencia de los linfocitos citotóxicos p. ej., mediante un ensayo de potencia no específico que mide la liberación de citocinas después de la estimulación con OKT3. Las células T pueden considerarse potentes si, por ejemplo, la liberación de interferón (IFN) es mayor que aproximadamente 50 pg/mL, mayor que aproximadamente 100 pg/mL, mayor que aproximadamente 150 pg/mL o mayor que aproximadamente 200 pg/mL. Una realización menos deseada del método comprende probar los linfocitos citotóxicos expandidos para detectar reactividad tumoral específica para identificar linfocitos citotóxicos reactivos al tumor.
- En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para promover la regresión de un cáncer en un mamífero que comprende (i) cultivar (es decir, previo a REP) linfocitos citotóxicos autólogos y/o linfocitos citotóxicos modificados genéticamente (en algunas realizaciones, linfocitos citotóxicos autólogos modificados genéticamente), incluyendo el uso de IL-2; (ii) expandir los linfocitos citotóxicos cultivados usando anticuerpo

OKT3, IL-2 y linfocitos alimentadores, en donde los linfocitos citotóxicos cultivados se enriquecen con células T CD8+ antes de la expansión de los linfocitos citotóxicos; (iii) proporcionar opcionalmente para la administración al mamífero quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa; y (iv) después de proporcionar opcionalmente para la administración quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa, proporcionar para la administración al mamífero los linfocitos citotóxicos expandidos, en donde los linfocitos citotóxicos proporcionados para la administración al mamífero tienen aproximadamente 19 días a aproximadamente 29 días de antigüedad, o aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días de antigüedad, o aproximadamente 26 días de antigüedad, con lo cual se promueve la regresión del cáncer en el mamífero. Por ejemplo, los linfocitos citotóxicos proporcionados para administración al mamífero pueden tener de 19 días a aproximadamente 29 días o de aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días de antigüedad. En algunas realizaciones, de aproximadamente 19 días a aproximadamente 29 días, o de aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días de antigüedad, o de aproximadamente 26 días de antigüedad. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados están modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. Los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados se modifican genéticamente utilizando un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados se modifican genéticamente antes o después del cultivo. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados se modifican genéticamente antes o después de expandir los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados utilizando el anticuerpo OKT3, IL-2 y linfocitos alimentadores, en donde los linfocitos citotóxicos cultivados se enriquecen con células T CD8+ antes de la expansión de los linfocitos citotóxicos. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del

mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la
 SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de
 unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena
 pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-
 L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14
 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de
 unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en
 donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5.
 En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la
 SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv)
 que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia
 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena
 sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de
 IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que
 comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones,
 la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es
 un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha
 cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas
 realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO:
 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende
 además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2,
 IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que
 comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas
 realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO:
 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a
 través de un enlazador.

En algunas realizaciones, el método comprende cultivar (por ejemplo, previo a REP) células T autólogas como
 se describe en el presente documento de aproximadamente 19 días a aproximadamente 29 días, o de
 aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días, o de aproximadamente 26 días. El método comprende
 además expandir (por ejemplo, REP) los linfocitos citotóxicos cultivados y opcionalmente proporcionar para la
 administración al mamífero quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa como se describe en el presente
 documento. Después de proporcionar opcionalmente la administración de quimioterapia de linfodepleción no
 mieloablativa, el método comprende proporcionar la administración al mamífero de los linfocitos citotóxicos
 expandidos como se describe en el presente documento, con lo cual se promueve la regresión del cáncer en
 el mamífero. En algunas realizaciones del método, los linfocitos citotóxicos proporcionados para administración
 no han sido examinados para determinar su reactividad tumoral específica. En algunas realizaciones, los
 linfocitos citotóxicos expandidos proporcionados para administración al mamífero son de aproximadamente 19
 días a aproximadamente 29 días o de aproximadamente 23 días a aproximadamente 29 días, o de
 aproximadamente 26 días de antigüedad. Por ejemplo, los linfocitos citotóxicos proporcionados para
 administración pueden ser de 19 días, 19.5 días o 19.8 días a 29, 29.5 o 29.8 días de antigüedad; de 23, 23.5
 o 23.8 a 29, 29.5 o 29.8 días de antigüedad; o de 26, 26.5 o 26.8 días de antigüedad.

En algunas realizaciones, el método comprende enriquecer células T cultivadas que contienen los linfocitos
 citotóxicos para células T CD8⁺ antes de la rápida expansión de las células. Después del cultivo de los linfocitos
 citotóxicos que contienen TIL en IL-2, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se despojan de células CD4⁺
 y enriquecidas para células CD8⁺ utilizando, por ejemplo, una separación de microperlas para CD8 (p. ej.,
 utilizando un sistema de microperlas para CD8 CliniMACS® Plus (disponible comercialmente a través de
 Miltenyi Biotec)). En algunas realizaciones, las células T reguladoras CD4⁺ y CD25⁺ pueden impedir las
 respuestas antitumorales. En algunas realizaciones, enriquecer los linfocitos citotóxicos cultivados para
 linfocitos citotóxicos CD8⁺ y reducción o eliminación de células CD4⁺ pueden mejorar el impacto de células
 CD8⁺ antitumorales transferidas adoptivamente, mejorar las tasas de respuesta en los pacientes y/o reducir las
 toxicidades observadas por la producción de citocinas mediante células CD4⁺. En algunas realizaciones, el
 enriquecimiento de CD8⁺ de algunos cultivos de células T revela el reconocimiento de tumores *in vitro* que
 pueden no ser evidentes en el cultivo a granel y el reconocimiento mejorado *in vitro* de tumores en otros cultivos.
 En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos jóvenes CD8⁺ enriquecidos pueden funcionar de manera
 más confiable y predecible en expansiones rápidas a escala clínica que las células T a granel.

Expansión de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente mediante recipientes permeables al gas

Se divulga en el presente documento un método para promover la regresión del cáncer en un mamífero que
 comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar (es decir, previo a REP) la muestra de
 tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior; obtener
 linfocitos citotóxicos de la muestra de tejido tumoral; expandir (es decir, REP) el número de linfocitos citotóxicos
 en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células
 alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas; y administrar el número
 ampliado de linfocitos citotóxicos al mamífero. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican

genéticamente después del aislamiento de la muestra de tejido tumoral, pero antes del cultivo en dicho primer recipiente permeable al gas. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente después del cultivo en dicho primer recipiente permeable al gas, pero antes del cultivo en dicho segundo recipiente permeable al gas. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes de la administración de la cantidad ampliada de linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero. Véase, por ejemplo, los métodos descritos en publicación de patente de los Estados Unidos No. 2017/0152478, así como los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente utilizando un vector. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv)

que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente para su uso en la promoción de la regresión del cáncer, que se han expandido utilizando recipientes permeables a los gases, pueden ser más simples, requerir menos mano de obra, utilizar menos reactivos y pueden realizarse utilizando equipos más simples que los procedimientos que utilizan recipientes no permeables a los gases (p. ej., matraces T o matraces T-175, bolsas y placas de múltiples pocillos). Además, en algunas realizaciones, los recipientes permeables al gas pueden proteger las células de la contaminación microbiana de manera más efectiva que los recipientes no permeables al gas, que pueden ser sistemas "abiertos". Además, los métodos que utilizan recipientes permeables a los gases pueden, en algunas realizaciones, reducir la cantidad de recipientes que se utilizan en comparación con los métodos que utilizan recipientes no permeables a los gases, reduciendo así la cantidad de mano de obra necesaria para llevar a cabo los métodos y también reduciendo el riesgo de contaminación microbiana. Por lo tanto, la producción de células en recipientes permeables a los gases puede ser más adecuada para el cumplimiento de las condiciones actuales de buenas prácticas de fabricación (cGMP) que se requieren para, p. ej., ensayos clínicos de fase III. En algunas realizaciones, los métodos que utilizan recipientes permeables a los gases reducen el volumen de cultivo final a un nivel inferior al obtenido con recipientes no permeables a los gases, lo que puede reducir la capacidad de la incubadora requerida para cultivar las células y reduce la cantidad de reactivos (p. ej., medio de cultivo celular y aditivos) necesarios para el crecimiento de las células, y simplifica el equipo y/o procedimientos para concentrar y lavar las células. En algunas realizaciones, las células pueden alimentarse con menor frecuencia en recipientes permeables al gas (p. ej., aproximadamente cada tres o cuatro días) que en recipientes no permeables a los gases (p. ej., cada dos días), particularmente cuando las células y/o la muestra de tejido tumoral se cultivan sumergidos bajo al menos aproximadamente 1.3 cm de medio de cultivo celular en un recipiente permeable a los gases. En algunas realizaciones, las células en recipientes permeables a los gases se pueden manipular con menos frecuencia que las células en recipientes no permeables a los gases (p. ej., bolsas), lo que puede minimizar la alteración del fragmento del tumor y proporcionar un crecimiento de linfocitos citotóxicos más reproducible. En algunas realizaciones, se pueden automatizar varias partes del método, que incluyen, entre otras, el cultivo y/o la expansión de linfocitos citotóxicos. En algunas realizaciones, el uso de matraces permeables a los gases permite la generación de una cantidad suficiente de linfocitos citotóxicos, lo que permite el tratamiento de sujetos que anteriormente podrían no haber sido tratados con éxito porque no se generaron cantidades suficientes de linfocitos citotóxicos debido a las complejidades técnicas y logísticas de los métodos anteriores que no utilizan matraces permeables a los gases.

En algunas realizaciones, el método comprende además cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior. En una realización, la muestra de tejido tumoral se cultiva directamente en el material permeable al gas en el recipiente permeable al gas sin digestión. En otra realización, una muestra de tejido tumoral digerida enzimática o mecánicamente puede cultivarse directamente en el material permeable al gas. Se puede utilizar cualquier medio celular adecuado. El medio de cultivo celular puede comprender además cualquier factor de crecimiento de células T adecuado, tal como, p. ej., interleucina (IL)-2. El medio de cultivo celular puede comprender además opcionalmente suero AB humano. En algunas realizaciones, la muestra de tejido tumoral puede contener TIL que son autólogos del sujeto. En algunas realizaciones, el cultivo de la muestra de tejido tumoral incluye el cultivo de los TIL presentes en la muestra tumoral.

El método también comprende proporcionar TIL obtenido de la muestra de tejido tumoral. La muestra de tejido tumoral comprende TIL. A medida que la muestra de tejido tumoral se cultiva en el recipiente permeable al gas, p. ej., sobre el material permeable al gas en el recipiente, los TIL presentes en la muestra de tejido tumoral también comienzan a crecer en el recipiente permeable al gas, p. ej., sobre el material permeable al gas. Los TIL pueden obtenerse de la muestra de tejido tumoral de cualquier manera adecuada.

En algunas realizaciones, el primer recipiente permeable al gas puede ser cualquier recipiente permeable al gas adecuado. En algunas realizaciones, el primer recipiente permeable al gas comprende una base, lados y

una tapa. En algunas realizaciones, el recipiente comprende un soporte permeable al gas y un material permeable al gas, p. ej., una membrana permeable al gas. En algunas realizaciones, la base del recipiente comprende un soporte permeable al gas y un material permeable al gas, p. ej., una membrana permeable al gas. En algunas realizaciones, el material permeable al gas puede colocarse dentro del recipiente directamente sobre el soporte permeable al gas que comprende aberturas (p. ej., canales) en comunicación fluida con el gas ambiente para facilitar el intercambio de gases entre el interior del recipiente y el gas ambiente. En algunas realizaciones, la tapa puede comprender un respiradero y/o un puerto (p. ej., un puerto de acceso). En algunas realizaciones, el puerto de acceso puede tener una abertura mayor de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 1 cm (p. ej., mayor de aproximadamente 1 mm o mayor de aproximadamente 1 cm). Un puerto de acceso con una abertura mayor a aproximadamente 1 mm a aproximadamente 1 cm puede eliminar o reducir ventajosamente la perturbación del TIL. En algunas realizaciones, el recipiente permeable al gas comprende un respiradero o un puerto ventilado, lo que puede ser ventajoso en el caso de que la temperatura en el recipiente baje durante la manipulación. En algunas realizaciones, el primer recipiente permeable al gas es un recipiente permeable al gas como se describe en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2005/0106717y está disponible comercialmente a través de Wilson Wolf Manufacturing Corporation (p. ej., recipientes G-Rex10, GP200, G-Rex100, GP2000) (New Brighton, Minn.).

En algunas realizaciones, el primer recipiente permeable al gas tiene cualquier capacidad adecuada de volumen de medio celular. Por ejemplo, el primer recipiente permeable al gas puede tener una capacidad de volumen medio de aproximadamente 40 mL o más; aproximadamente 200 mL o más; aproximadamente 500 mL o más; aproximadamente 2,000 mL o más; o aproximadamente 5,000 mL o más. Aunque el primer recipiente permeable al gas puede tener cualquier capacidad de volumen de medio adecuada, la muestra de tejido tumoral y/o los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se pueden cultivar en cualquier volumen de medio adecuado. En algunas realizaciones, la muestra de tejido tumoral y/o los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se cultivan sumergidos bajo una altura de al menos aproximadamente 1.3 cm de medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la muestra de tejido tumoral y/o los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se cultivan sumergidos bajo una altura de al menos aproximadamente 2.0 cm de medio de cultivo celular. Las muestras de tejido tumoral y/o TIL cultivadas en un material permeable al gas sumergido bajo una altura de al menos aproximadamente 1.3 cm o una altura de al menos aproximadamente 2.0 cm de medio pueden, ventajosamente, manipularse y alimentarse con menor frecuencia.

En algunas realizaciones, el primer recipiente permeable al gas puede proporcionar cualquier área de superficie adecuada para el crecimiento de los linfocitos citotóxicos que contienen TIL. En algunas realizaciones, el recipiente permeable al gas puede tener un área de superficie para el crecimiento de los TIL de aproximadamente 10 cm² o más; aproximadamente 100 cm² o más; o aproximadamente 650 cm² o más.

En algunas realizaciones, la muestra de tejido tumoral y/o los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se cultivan dentro del primer recipiente permeable al gas en contacto con el material permeable al gas y se sumergen bajo un volumen adecuado de medio de cultivo. El cultivo de la muestra de tejido tumoral y/o TIL en contacto con el material permeable al gas facilita el intercambio de gases entre las células y el aire ambiente. Facilitar el intercambio de gases entre las células y el aire ambiente facilita la respiración, el crecimiento y la viabilidad de las células. En algunas realizaciones, el intercambio de gases a través del material permeable al gas puede facilitar la circulación del medio (p. ej., por convección y difusión) dentro del recipiente, lo que facilita la alimentación de los linfocitos citotóxicos que contienen TIL. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después del cultivo en el primer recipiente permeable al gas. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente utilizando un vector. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada

con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, el método comprende además expandir el número de linfocitos citotóxicos que contienen TIL en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas. En algunas realizaciones, el número de linfocitos citotóxicos que contienen TIL se expande utilizando una relación de aproximadamente 1 TIL por al menos aproximadamente 20 células alimentadoras, aproximadamente 1 TIL por al menos aproximadamente 25 células alimentadoras, aproximadamente 1 TIL por al menos aproximadamente 50 células alimentadoras, aproximadamente 1 TIL por al menos aproximadamente 100 células alimentadoras, aproximadamente 1 TIL por al menos aproximadamente 200 células alimentadoras, p. ej., una relación de células alimentadoras a TIL de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a

aproximadamente 100 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 200. En algunas realizaciones, el segundo recipiente permeable al gas puede ser como se describe para el primer recipiente.

En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados se expanden. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL cultivados se expanden rápidamente. La expansión rápida proporciona un aumento en la cantidad de linfocitos citotóxicos que contienen TIL de al menos aproximadamente 50 veces (o 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces, o más) durante un período de aproximadamente 10 días a aproximadamente 14 días y, en algunas realizaciones, durante aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, la expansión rápida proporciona un aumento de al menos aproximadamente 200 veces (o 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces o más) durante un período de aproximadamente 10 días a aproximadamente 14 días, y en algunas realizaciones, durante aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, la expansión rápida proporciona un aumento de al menos aproximadamente 1000 veces durante un período de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días, y en algunas realizaciones, aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, la expansión rápida proporciona un aumento de aproximadamente 1000 veces a aproximadamente 2000 veces, p. ej., aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 1500 veces o aproximadamente 2000 veces en un período de aproximadamente 14 días. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después de expandirse. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente utilizando un vector. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ

ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, la expansión (es decir, REP) se puede realizar en el recipiente permeable al gas mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se pueden expandir rápidamente utilizando la estimulación no específica del receptor de células T en presencia de células alimentadoras (p. ej., células alimentadoras alogénicas irradiadas, células alimentadoras autólogas irradiadas y/o células presentadoras de antígenos artificiales (p. ej., células de leucemia K562 transducidas con ácidos nucleicos que codifican CD3 y/o CD8)) y ya sea interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15), y en algunas realizaciones, IL-2. En algunas realizaciones, la expansión del número de linfocitos citotóxicos que contienen TIL utiliza aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 4×10^9 células alimentadoras alogénicas y/o células alimentadoras autólogas, preferiblemente aproximadamente 2×10^9 a aproximadamente 3×10^9 células alimentadoras alogénicas y/o células alimentadoras autólogas. El estímulo del receptor de células T no específico puede incluir, por ejemplo, aproximadamente 30 ng/mL de OKT3, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 (disponible a través de ORTHO-MCNEIL, Raritan, N.J. o MILTENYI BIOTECH, Auburn, California). Alternativamente, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se pueden expandir rápidamente, por ejemplo, mediante la estimulación de los linfocitos citotóxicos que contienen TIL *in vitro* con un antígeno (uno o más, incluidas sus porciones antigénicas, tal como epítipo(s), o una célula) del cáncer, que puede expresarse opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), p. ej., 0.3 μ M MART-1:26-35 (27L) o gp100:209-217 (210M), en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como 300 UI/mL de IL-2 o IL-15, y en algunas realizaciones con IL-2. Otros antígenos adecuados pueden incluir, p. ej., NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, antígeno de cáncer de tirosinasa, MAGE-A3, SSX-2 y VEGFR2, o porciones antigénicas de los mismos. Los TIL inducidos *in vitro* se expanden rápidamente mediante la reestimulación con el mismo antígeno(s) del cáncer aplicados a las células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A2. Alternativamente, el TIL puede reestimularse, por ejemplo, con linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2, por ejemplo.

En algunas realizaciones, ampliar el número de TIL puede comprender el uso de aproximadamente 5,000 mL a aproximadamente 10,000 mL de medio celular, preferiblemente de aproximadamente 5,800 mL a aproximadamente 8,700 mL de medio celular. En una realización, la expansión del número de TIL no utiliza más de un tipo de medio de cultivo celular. Se puede utilizar cualquier medio de cultivo celular adecuado, p. ej., medio de cultivo celular AIM-V (L-glutamina, 50 μ g/mL de sulfato de estreptomicina y 10 μ g/mL de sulfato de gentamicina) (Invitrogen, Carlsbad California). A este respecto, los métodos inventivos reducen ventajosamente la cantidad de medio y el número de tipos de medio necesarios para ampliar el número de linfocitos citotóxicos que contienen TIL.

En algunas realizaciones, ampliar el número de linfocitos citotóxicos que contienen TIL puede comprender alimentar las células con una frecuencia no mayor que cada tercer o cuarto día. Ampliar el número de células en un recipiente permeable al gas simplifica ventajosamente los procedimientos necesarios para ampliar el número de células al reducir la frecuencia de alimentación necesaria para ampliar las células.

En algunas realizaciones, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable al gas no está filtrado. Sin estar limitado a una teoría en particular, se cree que los componentes séricos particulados presentes en

algunos suplementos del medio celular (p. ej., suero AB) tienen poco o ningún efecto perjudicial sobre el crecimiento de TIL. El uso de medio celular sin filtrar puede, ventajosamente, simplificar los procedimientos necesarios para ampliar el número de células.

- 5 En algunas realizaciones, el medio celular en el primer y/o segundo recipiente permeable al gas carece de beta-mercaptoetanol (BME). En algunas realizaciones, la ausencia de BME del medio celular puede ser ventajosamente más compatible con cGMP (procedimientos actuales de buena fabricación) y, por lo tanto, puede facilitar ventajosamente la obtención de la aprobación regulatoria.

10 En algunas realizaciones, la duración del método comprende obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero; cultivar (es decir, previo a REP) la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior; obtener linfocitos citotóxicos que contienen TIL de la muestra de tejido tumoral; expandir (es decir, REP) el número de linfocitos citotóxicos que contienen TIL en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en el mismo utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas puede ser de aproximadamente 28 a aproximadamente 42 días, p. ej., aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después del cultivo, antes o después de obtener los linfocitos citotóxicos que contienen TIL, o antes o después de la expansión. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente utilizando un vector. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. También se describe que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ

ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar los linfocitos citotóxicos que contienen TIL expandido para su administración al mamífero. Los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se pueden proporcionar para administración mediante cualquier vía adecuada como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se proporcionan para administración como una infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura aproximadamente entre 30 y aproximadamente 60 minutos. Otros ejemplos de vías de administración incluyen intraperitoneal, intratecal e intralinfática. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes de proporcionar su administración. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente utilizando un vector. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301GPDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en

la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en el mismo vector. En algunas realizaciones, las cadenas pesada y ligera están codificadas en vectores diferentes. En algunas realizaciones, la cadena pesada está codificada en un primer vector. En algunas realizaciones, la cadena ligera está codificada en un segundo vector. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Además de TIL, también se pueden obtener linfocitos citotóxicos, macrófagos, monocitos y células asesinas naturales (NK) de la muestra de tejido tumoral, cultivarlos y expandirlos como se describe en el presente documento para TIL. En consecuencia, el método también puede comprender proporcionar macrófagos, monocitos y células asesinas naturales (NK) para su administración al mamífero. En algunas realizaciones, los métodos se pueden emplear para expandir linfocitos citotóxicos.

En algunas realizaciones, se proporciona un factor de crecimiento de células T que promueve el crecimiento y la activación de los TIL y/o linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero ya sea concomitantemente con el TIL o posteriormente al TIL. El factor de crecimiento de células T puede ser cualquier factor de crecimiento adecuado que promueva el crecimiento y la activación de los TIL. Los ejemplos de factores de crecimiento de células T adecuados incluyen interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 e IL-12, que pueden usarse solos o en varias combinaciones, como IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, IL-7 e IL-15, IL-2, IL-7 e IL-15, IL-12 e IL-7, IL-12 e IL-15, o IL-12 e IL-2. IL-2 es un factor de crecimiento de células T preferido.

En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican para expresar un factor de crecimiento de células T que promueve el crecimiento y la activación de los TIL y/o los linfocitos citotóxicos. Los factores de crecimiento de células T adecuados incluyen, por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente. Se conocen en la técnica métodos adecuados de modificación. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos modificados expresan el factor

de crecimiento de células T en niveles altos. Las secuencias codificantes del factor de crecimiento de células T, tal como la de IL-12, están fácilmente disponibles en la técnica, al igual que los promotores, cuyo enlace operativo a una secuencia codificante del factor de crecimiento de células T promueve una expresión de alto nivel. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos pueden modificarse para expresar IL-12 como se describe en la publicación de solicitud de patente de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual No. WO 2010/126766.

En algunas realizaciones, dos citocinas pueden ser más eficaces que una sola citocina y, en algunas realizaciones, tres citocinas, p. ej., IL-2, IL-7 e IL-15, pueden ser más eficaces que dos citocinas cualesquiera. Se cree que la IL-15 mejora la respuesta de células T CD8⁺ específica del tumor. En este sentido, la administración de células cultivadas con IL-15 con IL-2 (tal como mediante una inyección en bolo) puede ser especialmente eficaz. En algunas realizaciones, se pueden proporcionar TIL y/o linfocitos citotóxicos modificados para expresar IL-15 para administración con IL-2 como una inyección en bolo.

El factor de crecimiento de células T se puede administrar por cualquier vía adecuada. Cuando se administra más de un factor de crecimiento de células T, se pueden administrar de forma simultánea o secuencial, en cualquier orden y por la misma vía o por vías diferentes. En algunas realizaciones, el factor de crecimiento de células T, tal como IL-2, se proporciona para administración por vía intravenosa como una inyección en bolo. En algunas realizaciones, la dosis del factor de crecimiento de células T, tal como IL-2, es lo que los expertos en la materia consideran alto. En algunas realizaciones, se proporciona una dosis de aproximadamente 720,000 UI/kg de IL-2 para administración tres veces al día hasta tolerancia, particularmente cuando el cáncer es melanoma. En algunas realizaciones, se proporcionan aproximadamente de 5 a aproximadamente 15 dosis de IL-2 para administración, con un promedio de alrededor de 8 dosis.

Los TIL y/o linfocitos citotóxicos pueden reconocer cualquiera de los antígenos únicos producidos como resultado de las aproximadamente 10,000 mutaciones genéticas codificadas por cada genoma de célula tumoral. Sin embargo, el antígeno no necesita ser único. Los TIL y/o los linfocitos citotóxicos pueden reconocer uno o más antígenos de un cáncer, incluida una porción antigénica de uno o más antígenos, tal como un epítipo, o una célula del cáncer. Un "antígeno de un cáncer" y un "antígeno del cáncer" pretenden abarcar todos los antígenos mencionados anteriormente. Si el cáncer es un melanoma, tal como un melanoma metastásico, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos pueden reconocer MART-1 (tal como MART-1:26-35 (27L)), gp100 (tal como gp100:209-217 (210M)) o un antígeno "único" o específico del paciente derivado de una mutación codificada por el tumor. Otros antígenos de melanoma adecuados que pueden ser reconocidos por los TIL pueden incluir, pero no se limitan a, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa (TRP)1, TRP2 y MAGE. Los TIL también pueden reconocer antígenos tales como, por ejemplo, NY-ESO-1, telomerasa, p53, HER2/neu, antígeno carcinoembrionario o antígeno específico de próstata, para el tratamiento de carcinoma de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata y similares.

En algunas realizaciones, el método proporcionado es un método para obtener un número expandido de TIL y/o linfocitos citotóxicos de un mamífero para inmunoterapia celular adoptiva que comprende proporcionar una muestra de tejido tumoral obtenida del mamífero; cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular en el mismo; obtener TIL y/o linfocitos citotóxicos de la muestra de tejido tumoral; expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en el mismo utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos están modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i)

determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Los TIL y/o linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente después de obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después del cultivo (es decir, previo a REP) la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente después de obtener los TIL y/o los linfocitos citotóxicos de la muestra de tejido tumoral. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente después de expandirse (es decir, REP) el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector

basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una

secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

5 En algunas realizaciones, el método comprende proporcionar una muestra de tejido tumoral obtenida del mamífero. La muestra de tejido tumoral puede obtenerse como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización de la invención.

10 En algunas realizaciones, el método comprende cultivar la muestra de tejido tumoral en un primer recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior. La muestra de tejido tumoral se puede cultivar en un primer recipiente permeable al gas como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización de la invención.

En algunas realizaciones, el método comprende obtener linfocitos citotóxicos que contienen TIL de la muestra de tejido tumoral. Los linfocitos citotóxicos que contienen TIL se pueden obtener de la muestra de tejido tumoral como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización de la invención.

15 En algunas realizaciones, el método comprende expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas. El número de TIL y/o linfocitos citotóxicos se puede ampliar como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización de la invención.

20 En algunas realizaciones, el método implica obtener un número expandido de TIL y/o linfocitos citotóxicos de un mamífero para inmunoterapia celular adoptiva, en donde el método comprende proporcionar una muestra de tejido tumoral obtenida del mamífero; obtener linfocitos citotóxicos que contienen TIL de la muestra de tejido tumoral; expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un recipiente permeable al gas que contiene medio celular en el mismo utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas. En algunas realizaciones, el recipiente permeable al gas es un primer recipiente permeable al gas. Proporcionar una muestra de tejido tumoral obtenida del mamífero, obtener TIL y/o linfocitos citotóxicos a partir de la muestra de tejido tumoral y expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas se puede llevar a cabo como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización de la invención. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en

la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, el método proporcionado es un método para promover la regresión del cáncer en un mamífero que comprende proporcionar una muestra de tejido tumoral obtenida del mamífero; obtener linfocitos citotóxicos que contienen TIL de la muestra de tejido tumoral; expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un primer recipiente permeable al gas y un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en el mismo utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas; y proporcionar el número expandido de TIL y/o linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero. En algunas realizaciones, proporcionar una muestra de tejido tumoral obtenida del mamífero, obtener TIL de la muestra de tejido tumoral, expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas, y proporcionar el número expandido de TIL y/o linfocitos citotóxicos para la administración al mamífero se puede llevar a cabo como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar TIL y/o linfocitos citotóxicos capaces de lisar células cancerosas. Los TIL y/o linfocitos citotóxicos pueden seleccionarse como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización de la invención. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos están modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas

realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

- En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente después de obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después de aislar los linfocitos citotóxicos que contienen TIL de la muestra de tejido tumoral. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes o después de expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas. En algunas realizaciones, los TIL y/o linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente antes de proporcionar la cantidad ampliada de TIL y/o linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero.
- En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos no se analizan para determinar su reactividad tumoral específica para identificar linfocitos citotóxicos reactivos al tumor antes de proporcionar su administración al paciente. La reactividad tumoral específica se puede probar mediante cualquier método conocido en la técnica, p. ej., midiendo la liberación de citocinas (p. ej., interferón- γ) después del cocultivo con células tumorales. Los métodos inventivos permiten ventajosamente promover la regresión del cáncer en un mamífero proporcionando linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero sin la necesidad de una evaluación previa para el reconocimiento de un tumor específico. Las realizaciones de los métodos pueden, si se desea, incluir la prueba de la potencia de los linfocitos citotóxicos de una manera no específica del antígeno antes de proporcionar los linfocitos citotóxicos para su administración al mamífero. En algunas realizaciones, se puede probar opcionalmente la potencia de los linfocitos citotóxicos, p. ej., mediante un ensayo de potencia no específico que mide la liberación de citocinas después de la estimulación con OKT3. Las células T pueden considerarse potentes si, por ejemplo, la liberación de interferón (IFN) es mayor que aproximadamente 50 pg/mL, mayor que aproximadamente 100 pg/mL, mayor que aproximadamente 150 pg/mL o mayor que aproximadamente 200 pg/mL. Una realización menos deseada del método comprende probar los linfocitos citotóxicos expandidos para detectar reactividad tumoral específica para identificar linfocitos citotóxicos reactivos al tumor.
- Otros métodos para el cultivo de TIL y/o linfocitos citotóxicos
- En algunas realizaciones, el método puede comprender además el cultivo del tejido tumoral mediante cualquier método adecuado que facilite la obtención de TIL y/o linfocitos citotóxicos de la muestra de tejido tumoral. En este sentido, el cultivo del tejido tumoral puede comprender el establecimiento de múltiples cultivos independientes, p. ej., microcultivos. Por ejemplo, el cultivo del tejido tumoral puede comprender el cultivo de fragmentos tumorales en placas, p. ej., placas de 24 pocillos. En algunas realizaciones, el tejido tumoral se cultiva sin un recipiente permeable al gas.
- En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar TIL y/o linfocitos citotóxicos capaces de lisar células cancerosas, mientras que, en otras realizaciones, el método no incluye seleccionar TIL capaces de lisar células cancerosas. Los TIL capaces de lisar células cancerosas se pueden seleccionar identificando los TIL que tienen cualquier rasgo adecuado asociado con la lisis de células cancerosas y/o la regresión del cáncer. Los rasgos de TIL adecuados ejemplares que pueden servir como base para seleccionar TIL pueden incluir la liberación de uno o más de IFN- γ tras el cocultivo con células tumorales autólogas; la expresión en la superficie celular de uno o más de CD8, CD27 y CD28; y la longitud de los telómeros. Sin estar limitado a una teoría en particular, se cree que la expresión en la superficie celular de uno o más de CD8, CD27 y CD28 y longitudes de telómero más largas están asociadas con respuestas clínicas objetivas positivas en los pacientes y la persistencia de las células *in vivo*. Preferiblemente, el rasgo es la liberación de IFN- γ tras el cocultivo con células tumorales autólogas. En una realización de la invención, los TIL seleccionados liberan aproximadamente 200 pg/mL o más de IFN- γ tras el cocultivo con células tumorales.
- En algunas realizaciones, la selección de TIL capaces de lisar células cancerosas comprende probar cultivos individuales para detectar la presencia del rasgo e identificar TIL que poseen el rasgo. Se conocen en la técnica métodos para analizar cultivos para detectar la presencia de uno o más de liberación de IFN- γ tras el cocultivo con células tumorales autólogas; expresión en la superficie celular de uno o más de CD8, CD27 y CD28; y longitud de los telómeros (los telómeros más largos se asocian con la regresión del cáncer).
- En algunas realizaciones, se puede seleccionar cualquier número de cultivos. Por ejemplo, se pueden seleccionar uno, dos, tres, cuatro, cinco o más cultivos. En realizaciones en las que se seleccionan dos o más cultivos, los cultivos seleccionados pueden combinarse y el número de TIL puede expandirse en uno (o más) recipientes permeables al gas. En realizaciones en las que se seleccionan dos o más cultivos, cada cultivo seleccionado se expande por separado en recipientes separados, incluidos recipientes permeables a los gases cuando se emplean dichos recipientes.
- En algunas realizaciones, el método puede comprender además expandir el número de TIL y/o linfocitos citotóxicos en un cultivo identificado en un segundo recipiente permeable al gas que contiene medio celular en su interior utilizando células alimentadoras alogénicas irradiadas y/o células alimentadoras autólogas irradiadas como se describe en el presente documento con respecto a cualquier realización de la invención. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que se expanden en un segundo recipiente permeable al gas son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se

modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende

la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Administración de la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente

Una vez ampliada a un número adecuado, la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente puede administrarse, p. ej., infundirse al sujeto utilizando cualquier método y/o dispositivo adecuado conocido en la técnica. Los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una

cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Las composiciones de la presente divulgación, p. ej., los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente de la presente divulgación pueden proporcionarse para administración ya sea solos o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden incluir una población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente como se describe en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferiblemente para administración intravenosa o inyección en un sitio del tumor.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden proporcionarse para su administración de una manera apropiada a la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración estarán determinadas por factores como la condición del paciente y el tipo y gravedad de su enfermedad, aunque las dosis apropiadas podrán determinarse mediante ensayos clínicos.

Cuando se indica "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y condición del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente descritos en el presente documento se puede administrar en una dosis de 10^4 a 10^{11} células/kg de peso corporal (p. ej., 10^5 a 10^6 , 10^5 a 10^{10} , 10^5 a 10^{11} , 10^6 a 10^{10} , 10^6 a 10^{11} , 10^7 a 10^{11} , 10^7 a 10^{10} , 10^8 a 10^{11} , 10^8 a 10^{10} , 10^9 a 10^{11} , o 10^9 a 10^{10} células/kg de peso corporal), incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente también pueden administrarse varias veces en estas dosis. Los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente se pueden administrar mediante técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, p. ej., Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). La dosis óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular pueden ser fácilmente determinados por un experto en el arte de la medicina monitoreando al paciente para detectar signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

La administración de las composiciones de la presente invención puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden proporcionarse para administración a un paciente de forma sistémica o local (p. ej., en el sitio de un tumor). Las composiciones descritas en el presente documento pueden proporcionarse para administración a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente divulgación se proporcionan para administración a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En algunos casos, las composiciones de la presente divulgación se proporcionan para administración mediante inyección intravenosa. Las composiciones de la presente divulgación pueden proporcionarse para inyección directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos que contienen TIL expandidos, linfocitos citotóxicos y/o linfocitos citotóxicos modificados genéticamente producidos por los métodos divulgados se proporcionan para

administración como una infusión intraarterial o intravenosa. En algunas realizaciones, la administración dura aproximadamente entre 30 y aproximadamente 60 minutos. En algunas realizaciones, las vías de administración incluyen intraperitoneal, intratecal e intralinfática. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente después de obtener una muestra de tejido tumoral del mamífero, en cualquier momento durante la expansión, pero antes de proporcionar su administración a un mamífero. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente utilizando un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena

sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Métodos de linfodepleción

En algunos ejemplos, se administra quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa al mamífero antes de administrarle los linfocitos citotóxicos expandidos obtenidos de los linfocitos infiltrantes del tumor. El objetivo de la linfodepleción es hacer espacio para los linfocitos infundidos, en particular eliminando las células T reguladoras y otras células T no específicas que compiten por las citocinas homeostáticas. La quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa puede ser cualquier terapia adecuada, que puede administrarse por cualquier vía adecuada conocida por una persona experta. La quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa puede comprender, por ejemplo, la administración de ciclofosfamida y fludarabina, particularmente si el cáncer es melanoma, que puede ser metastásico. En algunas realizaciones, la vía de administración de ciclofosfamida y fludarabina es intravenosa. Asimismo, se puede administrar cualquier dosis adecuada de ciclofosfamida y fludarabina. Preferiblemente, se administran alrededor de 40-80 mg/kg, tal como alrededor de 60 mg/kg de ciclofosfamida durante aproximadamente dos días, después de lo cual se administran alrededor de 15-35 mg/m², tal como alrededor de 25 mg/m² de fludarabina durante unos cinco días, especialmente si el cáncer es melanoma.

En algunos ejemplos, se administra quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa al mamífero antes de administrarle los linfocitos citotóxicos que están modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de

unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Terapias combinadas

Una terapia adecuada puede incluir la exposición de un sujeto a una o más medidas de linfodepleción antes de la administración de los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente de la presente divulgación. Las medidas de linfodepleción pueden tomar la forma de quimioterapia o radioterapia. Las medidas de quimioterapia adecuadas pueden incluir, p. ej., tratamiento con ciclofosfamida y/o fludarabina.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, las células se expandieron utilizando los métodos descritos en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento u otros métodos conocidos en la técnica donde los linfocitos se expanden a niveles terapéuticos, se proporcionan para la administración a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero no se limitan a, el tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes con MS o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con PMI. En otras realizaciones, los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente de la invención se pueden usar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasas 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, 1 993). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente divulgación se proporcionan para administración a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) del trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia como

fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente divulgación se proporcionan para administración después de una terapia ablativa de células B, como agentes que reaccionan con CD20, p. ej., Rituxán. Por ejemplo, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica. Después del trasplante, los sujetos pueden recibir una infusión de los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente expandidos de la presente divulgación. En una realización adicional, se proporcionan células expandidas para su administración antes o después de la cirugía.

Las células expandidas proporcionadas para administración antes o después de la cirugía están modificadas genéticamente. Los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-

L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunas realizaciones, se proporcionan linfocitos citotóxicos modificados genéticamente para su administración simultáneamente con un fármaco o terapia estándar contra el cáncer. Existen numerosos medicamentos y terapias contra el cáncer disponibles para combinar con los métodos y composiciones actuales. La siguiente es una lista no exhaustiva de medicamentos contra el cáncer (antineoplásicos) que pueden usarse junto con la irradiación: Acicivina; Aclarrubicina; Clorhidrato de acodazol; AcrQnina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramicina; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfano; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimero; Carboplatino; Carmustina; Clorhidrato de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de Eflomitina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Clorhidrato de Epirubicina; Erbulozol; Clorhidrato de Esorubicina; Estramustina; Fosfato Sódico de Estramustina; Etanidazol; Aceite Etiodizado 1131; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Clorhidrato de Gemcitabina; Oro Au 198; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarrubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Iproplatino; Clorhidrato de Irinotecano; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolida; Clorhidrato de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maytansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedpa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Clorhidrato de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamina; Ormaplatino; Oxisurano; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromano; Pipsulfano; Clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero Sódico; Porfíromicina; Prednimustina; Clorhidrato de Procarbrazina; Puomicina; Clorhidrato de Puomicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina; Clorhidrato de Espirogermanio; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalano Sódico; Tegafur; Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teróxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Clorhidrato de Topotecano; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Clorhidrato de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredpa; Vapreótido; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; Clorhidrato de Zorrubicina.

Sujetos aptos para el tratamiento

Los sujetos adecuados para el tratamiento con los métodos y composiciones divulgados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen (p. ej., diagnosticado con) o en riesgo de tener cáncer y/o una infección viral crónica. Los tipos de cáncer que pueden ser susceptibles de tratamiento a través de los métodos y composiciones divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, melanoma metastásico, linfoma, leucemia y tumores sólidos de origen pancreático o cerebral. Los tipos de infección viral crónica que pueden ser susceptibles de tratamiento a través de los métodos y composiciones divulgados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, enfermedades linfoproliferativas postrasplante (PTLD) asociadas con la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus del papiloma humano (HPV), el citomegalovirus y la infección por adenovirus. Los sujetos infectados con los virus de la hepatitis C y B también pueden ser susceptibles de tratamiento a través de los métodos y composiciones divulgados en el presente documento.

Los cánceres que se pueden tratar incluyen tumores que no están vascularizados o que aún no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (tal como tumores hematológicos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres que se tratarán con los métodos y composiciones de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o neoplasias malignas linfoides, tumores benignos y malignos y neoplasias malignas p. ej., sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen tumores/cánceres en adultos y tumores/cánceres pediátricos.

Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre o de la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hematológicos (o hematógenos) incluyen leucemias, incluidas leucemias agudas (como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tal como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de la cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que generalmente no contienen quistes ni áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre según el tipo de células que los forman (tal como sarcomas, carcinomas y linfomas). Los ejemplos de tumores sólidos, tal como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia linfóide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (tal como un glioma (tal como glioma del tronco encefálico y gliomas mixtos), glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), astrocitoma, linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, craneofaringioma Schwannoma, ependimoma, pineaioma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales.

Los métodos divulgados en el presente documento pueden promover la regresión del cáncer. Promover la regresión del cáncer en un mamífero puede incluir el tratamiento o la prevención del cáncer en el mamífero. Los términos "tratar", "prevenir" y "regresión", así como las palabras derivadas de los mismos, tal como se utilizan en el presente documento, no implican necesariamente una regresión del 100 % o completa. Más bien, existen diversos grados de tratamiento, prevención y regresión que una persona con conocimientos ordinarios en la materia reconoce como poseedores de un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este respecto, los métodos divulgados en el presente documento pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento, prevención o regresión del cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento, la prevención o la regresión proporcionados por el método de la invención pueden incluir el tratamiento, la prevención o la regresión de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, p. ej., cáncer. Además, para los fines del presente documento, "tratamiento", "prevención" y "regresión" pueden abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o de un síntoma o condición de la misma.

En algunas realizaciones, se proporcionan linfocitos citotóxicos para su administración como parte del régimen de tratamiento. En algunas realizaciones, se proporciona una proteína de unión a PD-L1 para su administración como parte del régimen de tratamiento. En algunas realizaciones, se proporcionan linfocitos citotóxicos en combinación con una proteína de unión a PD-L1 para su administración como parte del régimen de tratamiento. En algunas realizaciones, se proporcionan linfocitos citotóxicos modificados genéticamente para su administración como parte del régimen de tratamiento. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos son linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican

genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG 1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Métodos para producir linfocitos citotóxicos modificados genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión al ligando 1 de muerte programada soluble 1 (PD-L1)

Los métodos para producir linfocitos citotóxicos modificados genéticamente de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir una o más de las etapas de aislamiento, modificación genética y expansión descritas anteriormente.

Los linfocitos genéticamente citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente elaborados de acuerdo con la presente invención se han modificado genéticamente utilizando un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de

IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

Kits

La presente divulgación también proporciona kits que incluyen una o más composiciones de la presente divulgación, p. ej., seleccionadas de: (i) una proteína de unión a PD-L1 de acuerdo con la presente divulgación (p. ej., scFv, maxicuerpo y similares), p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, (ii) uno o más ácidos nucleicos (p. ej., vectores) que incluyen una o más secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de unión a PD-L1 de acuerdo con la presente divulgación, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento, y (iii) una o más células genéticamente modificadas (p. ej., un linfocito citotóxico) (p. ej., en una composición que incluye uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables) de acuerdo con la presente divulgación, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento. Se pueden incluir linfocitos citotóxicos en el kit. Es posible que se incluya en el kit una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, se incluyen en el kit linfocitos citotóxicos en combinación con una proteína de unión a PD-L1. Es posible que en el kit haya linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. Los linfocitos citotóxicos pueden ser linfocitos citotóxicos modificados genéticamente. Los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente con un vector viral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus. En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 38A1 (SEQ ID NO: 37; Figura 11A, Figura 16A). En algunas realizaciones, el vector viral es pLV4301G PDLV scFV 19H9 (SEQ ID NO: 38; Figura 11B, Figura 16B). En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en gammaretroviral. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en pMSCIV. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 19H9. En algunas realizaciones, el vector viral codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector basado en lentivirus que codifica 38A1. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector viral basado en pLEV que codifica 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 19H9. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar 38A1. En algunas realizaciones, los TIL y/o los linfocitos citotóxicos se modifican genéticamente para expresar y secretar una proteína de unión a PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 comprende una porción de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una capacidad de unión mayor o aumentada en el melanoma en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas en un ensayo de citometría de flujo utilizando una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente, y (ii) comparando el número de células positivas para PD-L1 obtenidas con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándolas con 19H9, en donde un aumento en el porcentaje de células positivas para PD-L1 detectadas por citometría de flujo en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la capacidad de unión aumentada se mide (i) determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de células positivas para PD-L1 en un ensayo de citometría de flujo que se han marcado con una proteína de unión a PD-L1 marcada con o detectable por una etiqueta fluorescente y (ii) comparando la MFI obtenida con la proteína de unión a PD-L1 con un anticuerpo de control o comparándola con 19H9, en donde un aumento en la MFI de la población celular total por citometría de flujo con la proteína de unión a PD-L1 en comparación con un anticuerpo de control o 19H9 indica un aumento en la capacidad de unión (véase, por ejemplo, el ensayo del Ejemplo 3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la proteína 38A1 exhibe una función biológica mayor o aumentada en las células Jurkat en comparación con 19H9. En algunas realizaciones, la función biológica incluye el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la función biológica incluye la inhibición de la vía de señalización de PD-1 y PD-L1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 exhibe una capacidad

de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína 19H9 exhibe una capacidad de secreción mayor o aumentada en células Jurkat en comparación con 38A1. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 2 (CDR-L1), SEQ ID NO: 3 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 4 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR de la SEQ ID NO: 6 (CDR-H1), SEQ ID NO: 7 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En el presente documento se divulga que la proteína de unión a PD-L1 es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende CDR de la SEQ ID NO: 10 (CDR-L1), SEQ ID NO: 11 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 12 (CDR-L3) y dicha cadena pesada comprende CDR que comprenden la SEQ ID NO: 14 (CDR-H1), SEQ ID NO: 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO: 16 (CDR-H3). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 1 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde dicha cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende además una secuencia de IgG1 (es decir, conjugado con una secuencia de IgG1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a PD-L1 es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la conjugación es directa. En algunas realizaciones, la conjugación se realiza a través de un enlazador.

En algunos casos, un kit de acuerdo con la presente invención incluye material didáctico adecuado, p. ej., para practicar métodos como los descritos en el presente documento, p. ej., en relación con cualquier realización descrita en el presente documento.

Ejemplos

Como se puede apreciar a partir de la divulgación proporcionada anteriormente, la presente divulgación tiene una amplia variedad de aplicaciones. En consecuencia, los siguientes ejemplos se presentan con el fin de proporcionar a los expertos en la materia una descripción y divulgación completa de cómo realizar y utilizar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., 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 es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados Celsius y la presión es igual o cercana a la atmosférica. Se pueden utilizar abreviaturas estándar, p. ej., pb, par(es) de base(s); kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s o sec, segundo(s); min, minuto(s); h o hr, hora(s); aa, aminoácido(s); nt, nucleótido(s); y similares.

Ejemplo 1: Proteínas de unión a PD-L1 con una porción de unión al antígeno

Se generaron anticuerpos recombinantes específicos para PD-L1 (scFV anti-PD-L1 fusionado al dominio Fc humano de IgG humana). Utilizando una biblioteca de presentación de fagos scFV (Viva Biotechnologies), se aislaron varios scFV específicos para PD-L1. Dos scFV se unieron a PD-L1 nativo y se denominaron 38A1 y 19H9. 38A1-scFV, 19H9-scFV y FMC63-scFV (control negativo de scFV anti-CD19) se fusionaron al dominio Fc de la IgG1 humana (38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc y FMC63-scFV-Fc). Estos se construyeron en plásmidos lentivirales y retrovirales utilizando la recombinación del fago lambda multisitio "Gateway" (p. ej., véase la Figura 1). Cada secuencia de scFV fue flanqueada por los sitios de recombinación attL1 y attR5, sintetizados por Geneart (Life Technologies) y subclonados en pMK. La secuencia de IgG1 Fc fue flanqueada por los sitios de recombinación attL5 y attL2, sintetizados por Geneart (Life Technologies) y subclonados en pMK. Cada scFV

se recombinó con IgG1-Fc en un plásmido lentiviral (pLVU3pIRESeGFP; Figura 2) o un plásmido retroviral (pMSCVIRESeGFP; Figura 3). Las construcciones recombinadas consisten en una fusión del scFV (38A1, 19H9 o FMC63) fusionado a IgG1-Fc a través de un sitio de recombinación attB5.

Para determinar la afinidad de los maxicuerpos 38A1-scFV-Fc (SEQ ID NO: 17) y 19H9-scFV-Fc (SEQ ID NO: 19) para PD-L1 (utilizando 12D10-scFV-Fc, un reactivo específico de proteína asociada a microtúbulos, como control negativo), se realizó un "ELISA basado en células" utilizando 293-PD-L1. Se observó que la afinidad de 38A1-scFV-Fc ($EC_{50} = 0.1248$) era 3.2 veces mayor que la de 19H9-scFV-Fc ($EC_{50} = 0.4039$; Figura 5).

Las células T Jurkat fueron transducidas con lentivirus que codificaban 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc o FMC63-scFV-Fc. Se cocultivaron 293-PD-L1 en una proporción de 1:1 durante 16 horas con células T Jurkat que secretaban de manera estable 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc o FMC63-scFV-Fc. Descubrimos que 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc pero no FMC63-scFV-Fc se unieron a 293-PD-L1. En comparación con 19H9-scFV-Fc, observamos una unión mejorada superior a 1.5 veces de 38A1-scFV-Fc a 293-PD-L1 (Figura 5). Este resultado fue consistente con una mayor afinidad de 38A1-scFV-Fc en comparación con 19H9-scFV-Fc para PD-L1.

Las líneas TIL M1034 y M1015 fueron transducidas con lentivirus que codificaban 38A1-scFV-Fc, 19H9-scFV-Fc o FMC63-scFV-Fc. Después de clasificar para el correportero eGFP y expandir *in vitro*, se recolectaron sobrenadantes de TIL que secretaban FMC63-scFV-Fc y 38A1-scFV-Fc, se concentraron diez veces y se usaron para teñir 293-PD-L1. En comparación con el maxicuerpo de control negativo (FMC63-scFV-Fc), observamos un aumento de más de 50 veces en la unión de 38A1-scFV-Fc a 293-PD-L1 (Figura 6).

A continuación, se evaluó la capacidad de 38A1-scFV-Fc y 19H9-scFV-Fc para liberar la inhibición de la actividad de las células T bloqueada por PD-L1. Para ello, se añadieron 12D10-scFV-Fc (control negativo específico de proteína asociada a microtúbulos), 19H9-scFV-Fc y 38A1-scFV-Fc a un cocultivo de células T Jurkat que producen luciferasa de luciérnaga cuando se activan y células CHO diseñadas para activar las células T, pero también inhibir dicha activación a través de la sobreexpresión de PD-L1 como se describió anteriormente. La adición de 38A1-scFV-Fc y 19H9-scFV-Fc, pero no de 12D10-scFV-Fc al co-cultivo de Jurkat/CHO condujo a una mayor actividad bioluminiscente. En ambos casos, la "desinhibición" de PD-L1 dependió de la dosis. La capacidad de 38A1-scFV-Fc para inducir actividad bioluminiscente fue 3.6 veces mayor que la de 19H9-scFV-Fc, lo que coincide con la diferencia de 3.2 veces observada en la afinidad por PD-L1 (Figura 7).

Ejemplo 2: Producción de TIL que expresan el scFv PD-L1

Producción viral

Etapas del método:

1) Sembrar 5×10^6 células Phoenix en una placa de cultivo de tejido de 10 mm que contiene 5 mL de medio de cultivo celular

2) Transfectar las células con 10 μ g de pLEV (vector lentiviral) que contiene scFV anti-PD-1 y 6 μ g de pVSV-G usando lipofectamina.

3) Después de 60 horas, recoger el sobrenadante y filtrar con un filtro 70 μ m en un tubo de 15 mL.

Transducción de células T

Etapas del método:

1) Activar 1×10^6 TIL con anti-CD3 a concentración de 300 ng/mL en 2 mL de medio de cultivo TIL en placa de 12 pocillos.

2) Después de 48 horas, dividir los TIL en dos pocillos y agregar 1 mL de sobrenadante (de la etapa 3 de la producción viral) en cada pocillo junto con polibreno a una concentración de 8 μ g/mL.

3) Centrifugar las células durante 30 minutos a 800 X g a 32 C.

4) Retirar el medio que contiene el virus y resuspender el sedimento celular con 2 mL de medio de cultivo completo fresco e incubar las células durante 24 horas.

5) Propagar las células utilizando el protocolo de expansión rápida (REP).

Ejemplo 3: Caracterización de 19H9 y 38A1

19H9 exhibe mayor capacidad de secreción

Meta: Comparar la capacidad de secreción de las células Jurkat que sobreexpresan el clon de ScFV anti-PD-L1 19H9 frente a 38A1.

En general, 19H9 muestra una mayor capacidad de secreción. En este trabajo se proporciona una comparación de la capacidad de secreción de las células Jurkat que sobreexpresan el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 frente al 38A1 en la Figura 12. El sobrenadante de las células Jurkat que sobreexpresan el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 y 38A1 se recolectó y se concentró para el ensayo ELISA de IgG para determinar la concentración de ScFV anti-PD-L1. Se encontró que el clon de las células Jurkat 19H9 tenía mayor capacidad de secreción en comparación con 38A1 (9.82 frente a 6.75 µg/células).

38A1 exhibe mayor capacidad de unión en células Jurkat que sobreexpresan PD-L1

Meta: Examinar la afinidad de unión del clon ScFV anti-PD-L1 19H9 y 38A1 utilizando células EL4 PD-L1.

En general, 38A1 exhibe una mayor capacidad de unión en las células Jurkat que sobreexpresan PD-L1. Se examinó la afinidad de unión del clon ScFV anti-PD-L1 19H9 y 38A1 utilizando células EL4 PD-L1 (Figura 13). Las EL4 PD-L1 se incubaron con el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 o 38A1 a concentraciones de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL, y se tiñeron con Amcyan y FITC antihumano de cabra. Las células se lavaron con tampón FAC y se analizaron mediante citometría de flujo. El clon 38A1 exhibió una mayor capacidad de unión en las células Jurkat que sobreexpresaban PD-L1 tanto en el porcentaje de células positivas para PD-L1 (Figura 13A) y la media de intensidad de fluorescencia (MFI) (Figura 13B).

38A1 exhibe mayor capacidad de unión en células tumorales de melanoma

Meta: Para validar la unión de ScFV anti-PD-L1 en células tumorales.

En general, 38A1 exhibe una mayor capacidad de unión en las células tumorales de melanoma. En este trabajo se proporciona una comparación de la afinidad de unión del clon ScFV anti-PD-L1 19H9 y 38A1 utilizando células EL4 PD-L1 en la Figura 14. Las EL4 PD-L1 se incubaron con el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 o 38A1 a concentraciones de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL, y se tiñeron con Amcyan y FITC antihumano de cabra. Las células se lavaron con tampón FAC y se analizaron mediante citometría de flujo. El clon 38A1 exhibió una mayor capacidad de unión en las células Jurkat que sobreexpresaban PD-L1 tanto en el porcentaje de células positivas para PD-L1 (Figura 14A) como en la media de intensidad de fluorescencia (MFI) (Figura 14B). Para validar la unión de ScFV anti-PD-L1 en células tumorales, se trataron tres células tumorales de melanoma con IFN-gamma (100 ng/mL) para mejorar la expresión de PD-L1. Después de tres días, las células se recolectaron con tampón de disociación celular, se incubaron con el clon ScFV anti-PD-L1 19H9 o 38A1 a una concentración de 100 ng/mL y se tiñeron con FITC antihumano de cabra. Las células se lavaron con tampón FAC y se analizaron mediante citometría de flujo. Descubrimos que el clon 38A1 exhibió una mayor afinidad de unión tanto en el porcentaje de células positivas para PD-L1 como en MFI. En general, el clon 38A1 tiene una mayor afinidad de unión, pero una capacidad de secreción ligeramente menor en comparación con el clon 19H9.

38A1 exhibe una mayor función biológica

Meta: Para caracterizar más a fondo la función biológica de dos clones de ScFV anti-PD-L1 (19H9 y 38A1).

En general, 38A1 exhibe una mayor función biológica que 19H9. Para determinar más a fondo la función biológica de dos clones de ScFV anti-PD-L1 (19H9 y 38A1), se realizó un ensayo de bloqueo de PD-L1, que se puede utilizar para determinar la potencia del anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 que bloquea la interacción de PD-1 y PD-L1 (Figura 15). El ensayo consta de dos líneas celulares modificadas genéticamente: célula efectora PD-1 (células T Jurkat que expresan de forma estable PD-1 humana y luciferasa inducida por NFAT) y células PD-L1 aAPC/CHO-K1 que expresan de forma estable PD-L1 humana con una proteína de superficie celular que activa TCR afines. Cuando se cocultivaron dos tipos de células, la interacción de PD-1 y PD-L1 inhibió la señalización de TCR y disminuyó la actividad de la luciferasa. La adición de un anticuerpo bloqueador anti-PD-1 o PD-L1 ayudó a liberar la señal inhibidora, lo que resultó en una mejor señalización de TCR y actividad de luciferasa mediada por NFAT. Se encontró que la señal de luciferasa (RLU) era mayor cuando se bloqueaba con anti-PD-L1 en comparación con anti-PD-1, lo que sugiere que bloquear PD-L1 parecía ser más efectivo que PD-1 en este contexto (Figura 15A). Como era de esperar, el clon de ScFV anti-PD-L1 38A1, que previamente había demostrado tener una mayor afinidad de unión, proporcionó una mayor función biológica debido al gran aumento de la señal de luciferasa tanto en configuraciones de ScFV purificado (P) como no purificado (NP) (Figura 15B).

REIVINDICACIONES

1. Una población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, en donde la población de linfocitos citotóxicos es una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y obtenible a partir de un método que comprende:
- 5 modificar genéticamente un linfocito citotóxico previamente aislado de un tumor del sujeto introduciendo en el linfocito citotóxico un ácido nucleico que codifica una proteína que se une específicamente a PD-L1, en donde el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa y secreta la proteína que se une específicamente a PD-L1;
- 10 expandir el linfocito citotóxico modificado genéticamente para generar la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente en donde los linfocitos citotóxicos modificados genéticamente son una población de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) modificados genéticamente; en donde la población de linfocitos citotóxicos modificados genéticamente es para administración al sujeto para tratar el tumor, en donde la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que se une específicamente a PD-L1 y en donde dicha proteína que se une específicamente a PD-L1 se selecciona de una de las siguientes proteínas:
- 15 a) una proteína en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5; y
- 20 b) una proteína en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13
- 20 en donde la proteína se selecciona de un anticuerpo, un maxicuerpo y un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), en donde el anticuerpo de cadena sencilla comprende el primer y segundo polipéptidos de (a) fusionados entre sí directamente o a través de un enlazador o el primer y segundo polipéptidos de (b) fusionados entre sí directamente o a través de un enlazador, y en donde el maxicuerpo comprende un scFv fusionado directamente o a través de un enlazador a un dominio Fc.
- 25 2. La población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de forma constitutiva la proteína que se une específicamente a PD-L1 o en donde el linfocito citotóxico modificado genéticamente expresa de forma inducible la proteína que se une específicamente a PD-L1.
- 30 3. La población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico se integra en el genoma del linfocito citotóxico.
- 40 4. La población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la proteína es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), en donde el anticuerpo de cadena sencilla comprende el primer y el segundo polipéptidos fusionados entre sí directamente o a través de un enlazador.
- 35 5. La población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el scFv comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 19.
- 40 6. La población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína es un maxicuerpo que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina fusionado directamente o a través de un enlazador a la porción de unión al antígeno y además en donde el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4.
- 45 7. La población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la proteína comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 20.
- 45 8. La población de linfocitos citotóxicos para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que es para su uso en el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto.

Figura 1

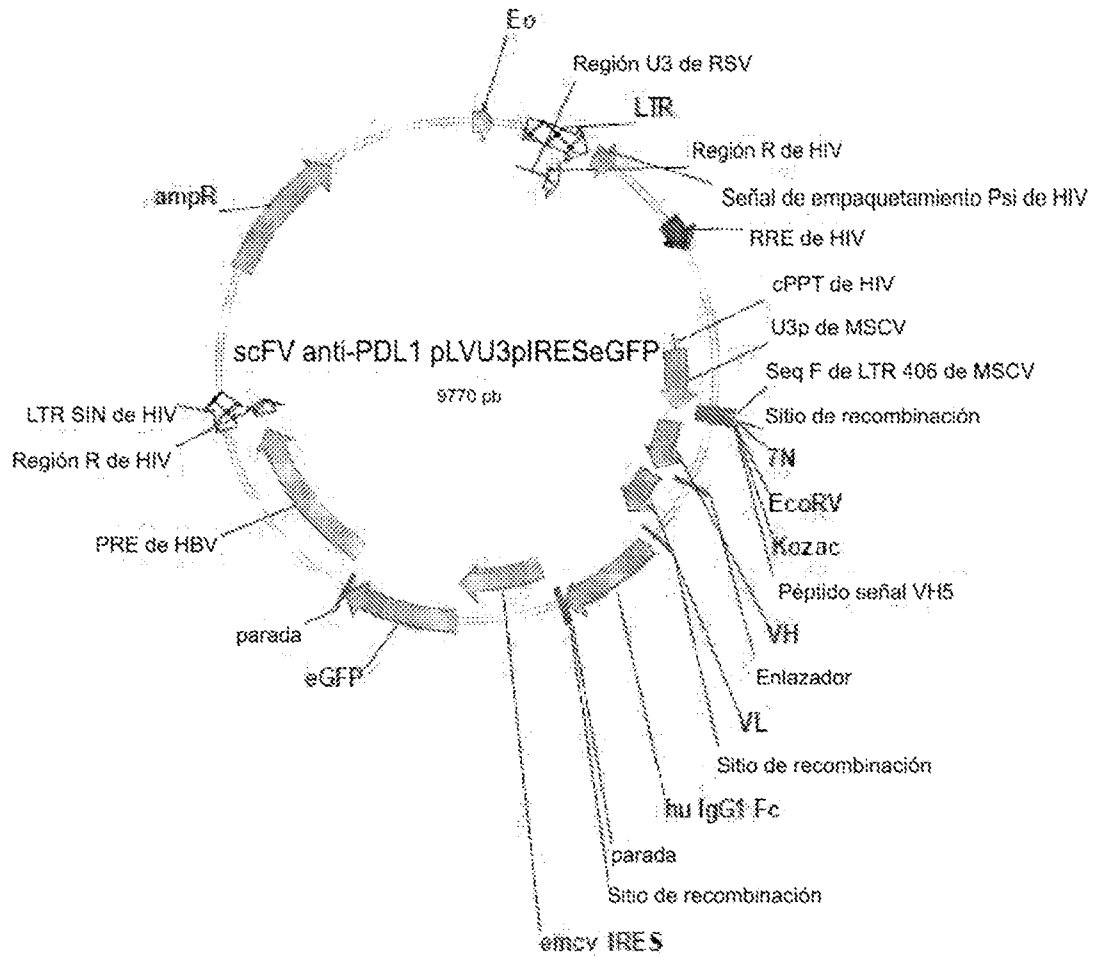


Figura 2

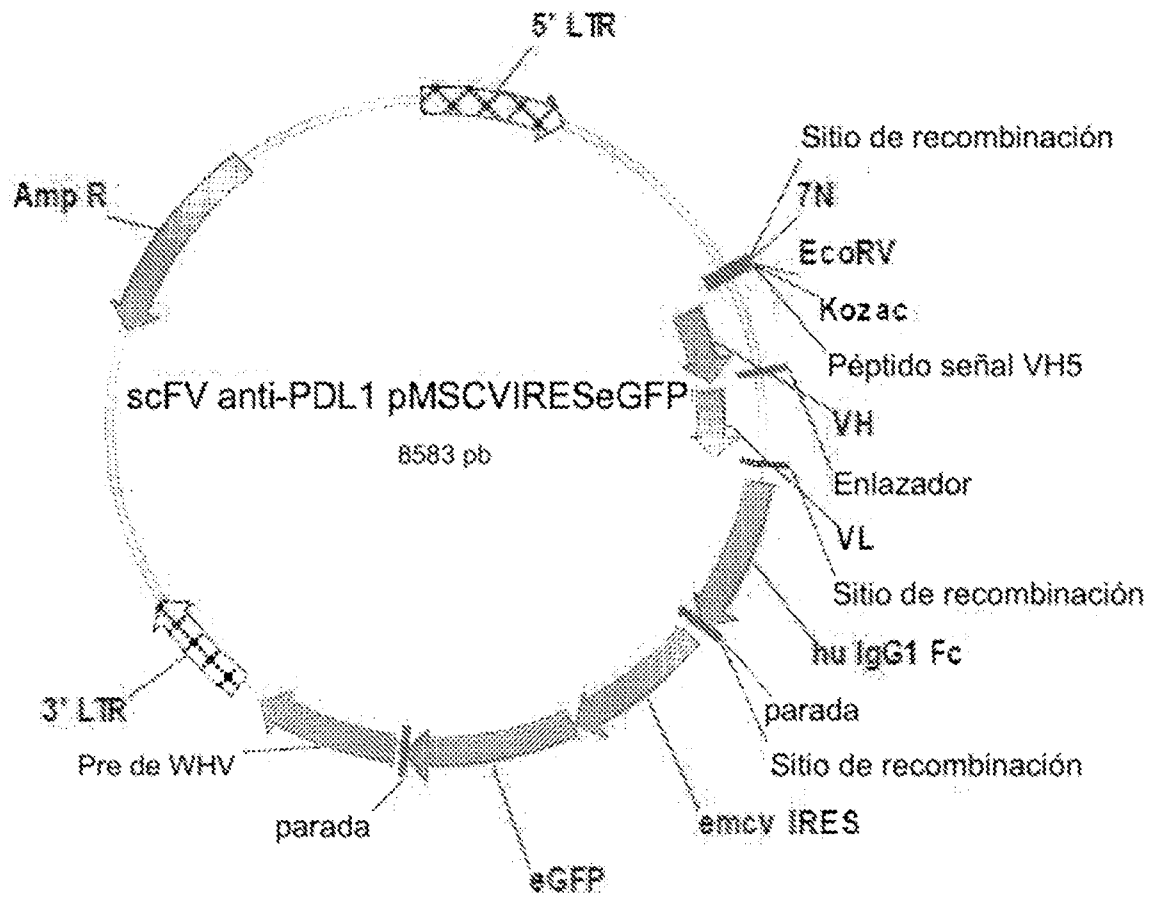


Figura 3

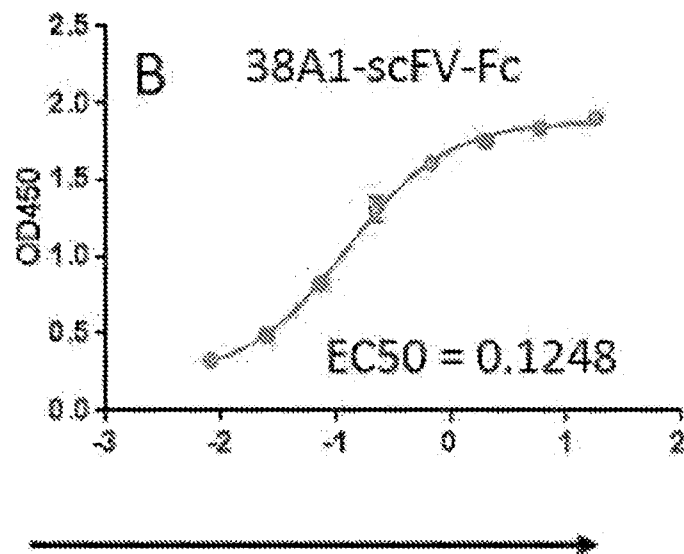
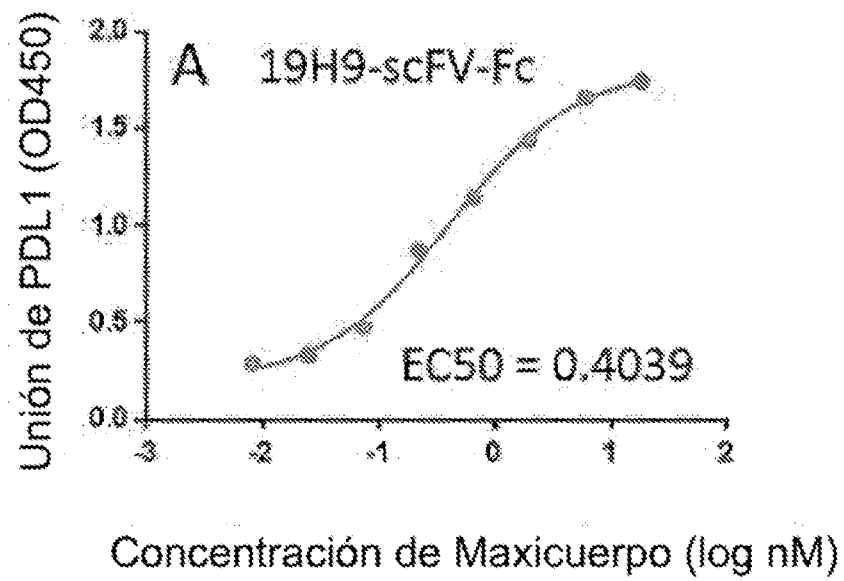


Figura 4

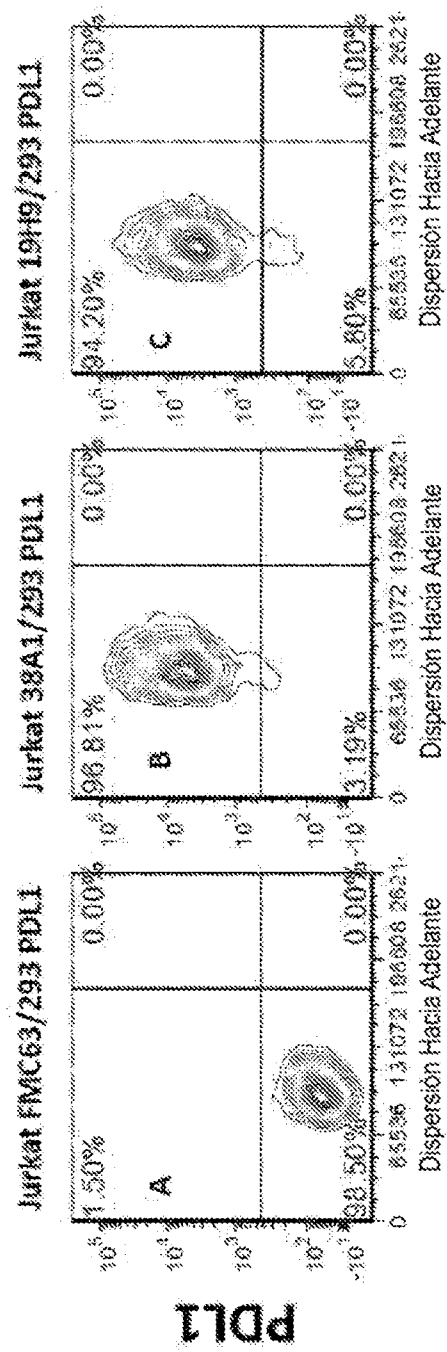


Figura 5

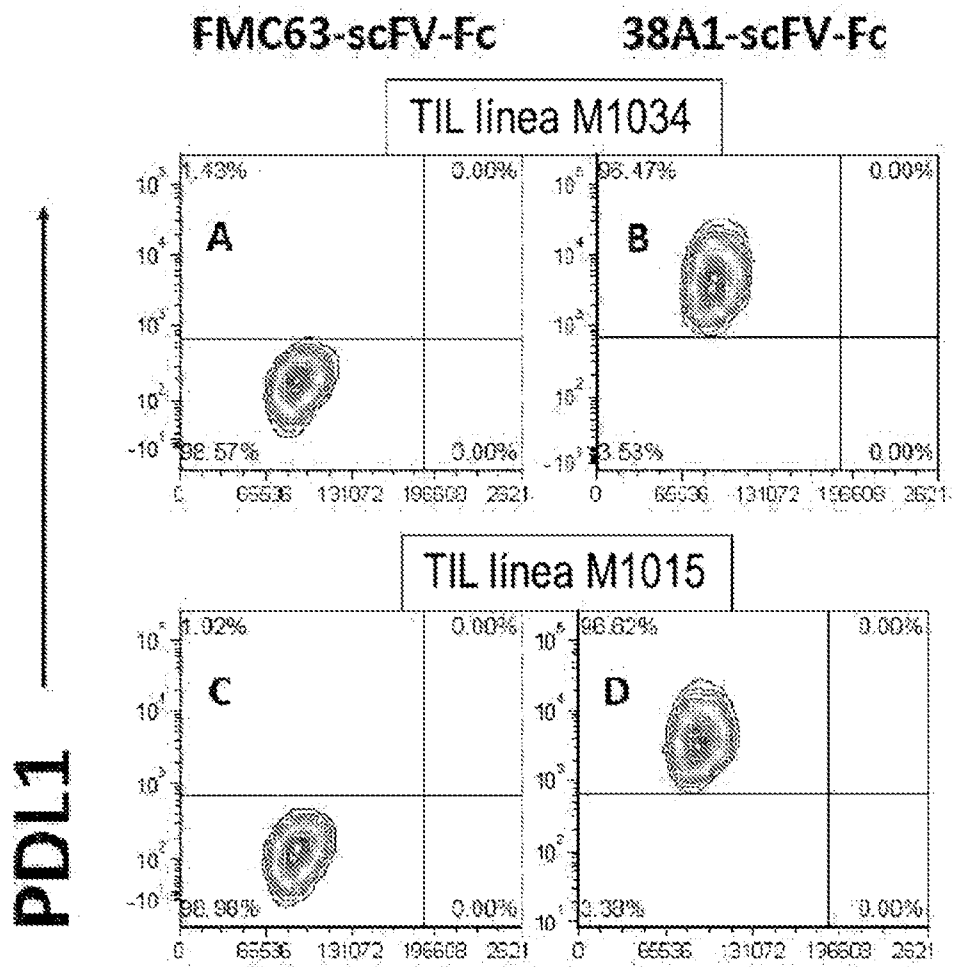


Figura 6

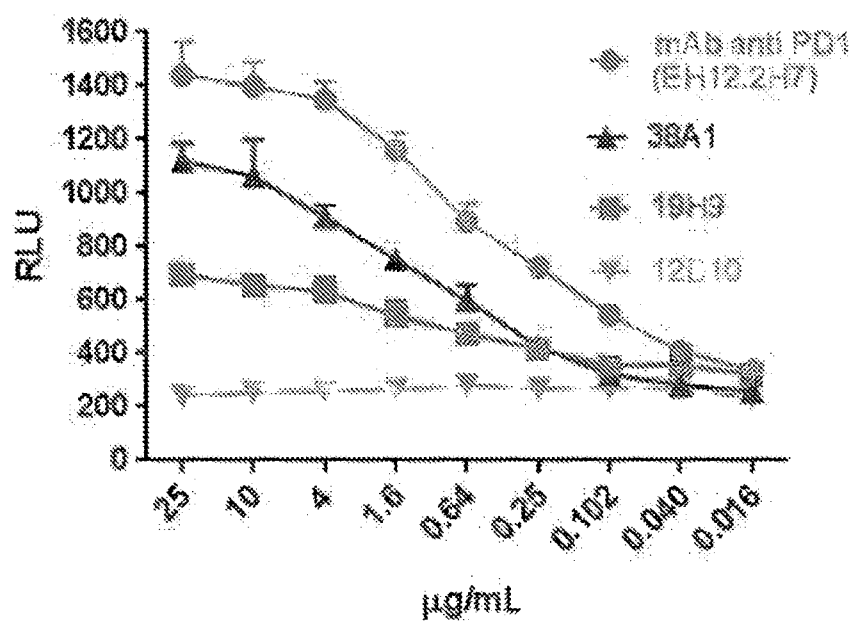


Figura 7

Anticuerpo 38A1

Cadena Ligera

SYVLTPPPSVSVAPGQTARITCGGN**NIGRK**I VHWYQQRPGQAPVLVIY**YDT**DRPAGIPERFSGSN
SGNMATLTISTVGAGDEADYYC**QVWDTGSDHVV**FGGGKLTVL
(SEQ ID NO: 1)

CDR1 (CDR-L1): **NIGRK**I (SEQ ID NO: 2)
CDR2 (CDR-L2): YDT (SEQ ID NO: 3)
CDR3 (CDR-L3): **QVWDTGSDHVV** (SEQ ID NO: 4)

Cadena Pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQAPGKGLEWVST**ISGSGGTT**YYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYC**AKDWFRSSSPDAFDI**WGQGTITVSA
(SEQ ID NO: 5)

CDR1 (CDR-H1): **GFTFSNYA** (SEQ ID NO: 6)
CDR2 (CDR-H2): **ISGSGGTT** (SEQ ID NO: 7)
CDR3 (CDR-H3): **AKDWFRSSSPDAFDI** (SEQ ID NO: 8)

Anticuerpo 19H9

Cadena Ligera

NFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTG**SGSIARKE**FVQWYQQRPGSSPTTVIY**ENN**QRP SGVSDRFSG
SIGSS5NSASLTISGLKTEDEADYYC**QSYDSSNVV**FGGGKVTVL
(SEQ ID NO: 9)

CDR1 (CDR-L1): **SGSIARKE**F (SEQ ID NO: 10)
CDR2 (CDR-L2): **ENN** (SEQ ID NO: 11)
CDR3 (CDR-L3): **QSYDSSNVV** (SEQ ID NO: 12)

Cadena Pesada

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSYS**MNWVRQAPGKGLEWVSG**INTAGDT**HYPESVKG
RFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYC**VREREREYSGYDAFDI**WGQGTITVSA
(SEQ ID NO: 13)

CDR1 (CDR-H1): **GFTFSYS**M (SEQ ID NO: 14)
CDR2 (CDR-H2): **INTAGDT** (SEQ ID NO: 15)
CDR3 (CDR-H3): **VREREREYSGYDAFDI** (SEQ ID NO: 16)

Figura 7 (cont.)

Ejemplo de un scFV 38A1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVK
GRFTISRDNSENKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWGQGTITVTVSAGGGGGSGG
GGGGGGSGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTAPITCGGNNIGRKIVHWYQQFPQGAPVLIYYDTRPA
GIPERFSGSNSGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGTTKLTVL
(SEQ ID NO: 17)

*La cadena pesada de 38A1 (SEQ ID NO: 5) es seguida por un
enlazador (negrita/subrayado), que es seguido por la cadena
ligera de 38A1 (SEQ ID NO: 1).

Ejemplo de una proteína con un scFV 38A1 fusionado a un dominio Fc (IgG1)

MGSTAILALLLAVLQGVSAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE
WVSTISGSGGTTYADSVKGRFTISRDNSENKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDI
WGQGTITVTVSAGGGGGSGGGGGSGGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQ
QRPQGAPVLIYYDTRPAGIPERFSGSNSGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGG
GTLTIVLGPANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNQ
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 18)

*La proteína de la SEQ ID NO: 17 (itálica/subrayada) es seguida por
un dominio Fc de IgG1 (negrita/subrayada).

Ejemplo de un scFV 19H9

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMNWVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKG
RFTISRDNARNISNLQMNSLRAEDTAVYYCVRRVEREYSGYDAFDIWGQGTITVTVSAGGGGGSGG
GGGGGGSGAPNEMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPQGSPTTVIYENNQ
RPSGVSDRPSGSISSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVVFGGTRKTVL
(SEQ ID NO: 19)

*La cadena pesada de 19H9 (SEQ ID NO: 13) es seguida por un
enlazador (negrita/subrayado), que es seguido por la cadena
ligera de 19H9 (SEQ ID NO: 9).

Ejemplo de una proteína con un scFV 19H9 fusionado a un dominio Fc (IgG1)

MGSTAILALLLAVLQGVSAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDMNWVRQAPGKGLE
WVSGINTAGDTHYPESVKGRTISRDNARNISNLQMNSLRAEDTAVYYCVRRVEREYSGYDAFDI
IWGQGTITVTVSAGGGGGSGGGGGSGGAPNEMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKFVQ
WYQQRPQGSPTTVIYENNQRPQSGVSDRPSGSISSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVV
FGGGIKVTVLGPANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 20)

*La proteína de la SEQ ID NO: 19 (itálica/subrayada) es seguida por
un dominio Fc de IgG1 (negrita/subrayada).

Figura 8

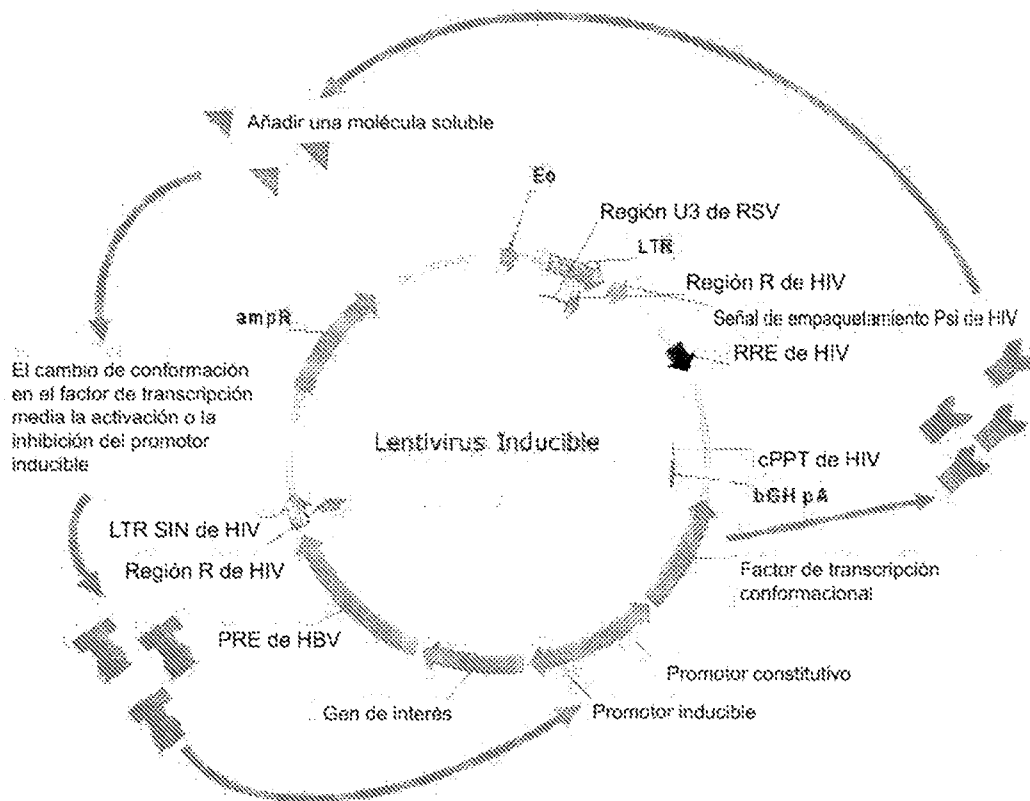


Figura 9

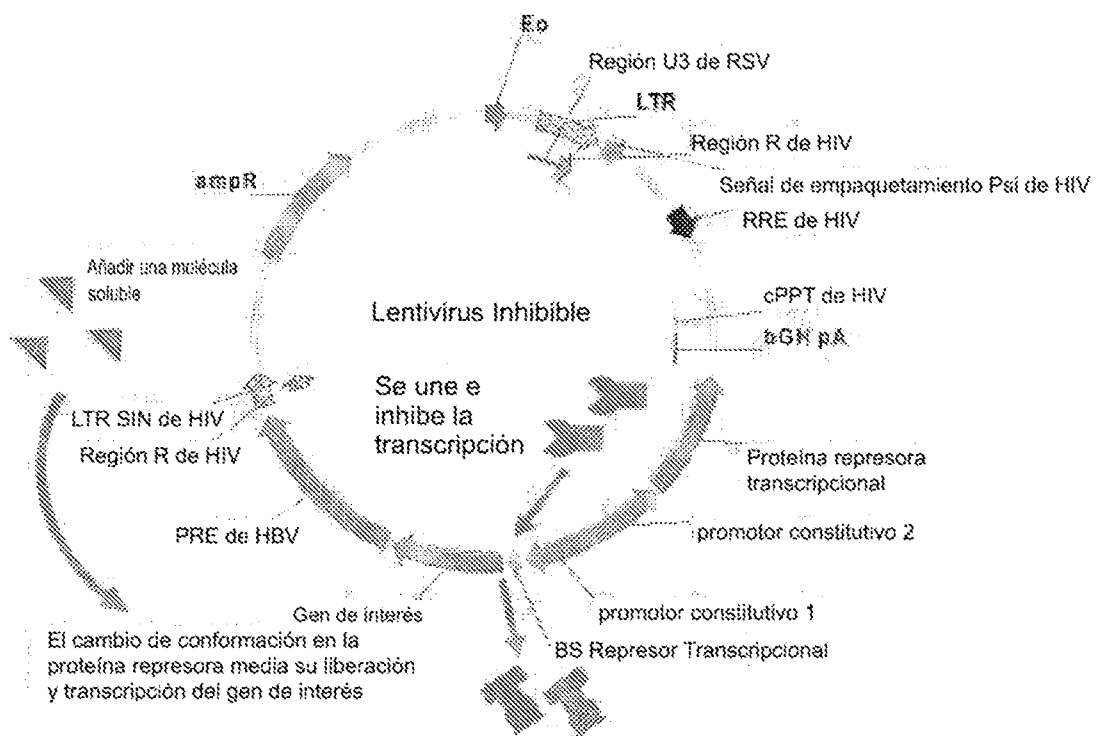


Figura 10A

pLV430G (Vector Lentiviral) (SEQ ID NO:35)

cgataaccctaattcgatagcatatgcttccggtgggtaacatatgctattgaattagggtagtctggatagtatatactactacccgggaa
gcatatgctacccgttaggggtcaccgggatgcccggccagatgctgcccggcgtagaggatctaattgtagttagctcactcattaggcacc
ccaggctttacatttatgcttccggctcgtatgttgggaattgtagcgggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattac
gccaaagcgcgaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactctttagtcttgcaaca
tggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgcccattgggtgggaagtaagggtgacgatcgtgcctta
ttaggaaggcaacagacgggctgacatggattggacgaaccactgaattgcccattgcagagatatgtatttaagtcctagctcgatac
ataaacgggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgctt
gagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtagtctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagt
ggcgcccgaacagggacttgaaagcgaagggaacacagaggagctctctcagcagcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaaga
ggcgaggggcgccgactggtgagtacgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgtcagttataag
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtagtgggcaagc
agggagctagaacgattcgagttaatctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaatactgggacagctacaacatcccttca
gacaggatcagaagaacttagatcattatataatcacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaa
gcttttagacaagatagaggaaagagcaaaaacaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagata
tgaggggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagag
tggtgacagagaaaaagagcagtgaggaaataggagcttcttcttgggttcttgggagcagcagggaagcactatggcgagcgtcaat
gacgctgacggtagcggcagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggtctattgaggcgcaacagcatctgtt
gcaactcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttgg
gggtgctctggaaaaactcatttgaccactgctgtgcttgggaatgctagtggagtaataatctctggaacagatttggaaatcacacgacct
ggatggagtgaggacagagaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaac
aagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattgggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattatcataatgatagt
aggagggcttgtaggtttaagaatagtttttgcgtgactttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattatcgttfcagaccacc
tcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaagggaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaac
ggatctcgacgggtatcgggttttaaaagaaaaggggggtattggggggtacagtgcagggggaaagaatagtagacataatagcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttatcgattttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagacccc
acctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaagggtta
ggaaacagagagacagcagaatatgggcaaacaggatatctgtggttaagcagttcctgccccggctcaggggcaagaacagatggtcccc
agatgcgggtccgcccctcagcagtttctagagaacctcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgcttatttgaact
aaccaatfcagttcgttctcgttctgttgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcgccgagtcct
ccgatagactgctgccccgggtaccgatatacaagtttgtacaaaaagctgaacgagaacgtaaatgatataaatatcaatatatta
aattagattttgcataaaaaacagactacataatactgtataaacacacatatccagtcactatggcggccgattaggcaccaccaggcttta
cactttatgcttccggctcgtataatgtgtggattttgagttaggatccgtcgagattttcaggagctaaggaagctaaaatggagaaaaaat
cactggatataccaccgttgatataatccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagacc
gttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttgcgcctgatgaa
tgctcatccggaaftccgtatggcaatgaaagacgggtgagctggtgatatgggatagtttacccttgttacaccgttttccatgagcaact
gaaacgftttcatcgtctggagtgaaatccacgacgatttccggcagtttctacacafataftcgcaagatgtggcgtgttacggtgaaacc
tggtctatttccctaaagggtttattgagaatatgttttctcagccaatccctgggtgagtttaccagtttattttaaactggccaatat
ggacaacttcttgcggccttttccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaagggtgctgatgcgctggcgattcaggttcatatgcc
gtttgtgatggcttccatgctggcagaatgcttaatgaattacaacagtaactcgatgagtgagggcgggcggtaaacgctggatccgg
cttactaaaaagccagataacagtatgcttatttgcgctgatttttgcggtataagaatatatactgatatgtataccgaagtatgtcaaaa
agaggtatgctatgaagcagctattacagtacagttgacagcgacagctatcagttgctcaaggcatatatgtatgtcaatatctcgggtct
ggtaagcacaacctgcagaatgaagccgctgctgctgctgccaacgctggaaagcggaataatcaggaaggagtggtgaggtgccccg
gtttattgaaatgaacggctcttttgcgacgagaacagggggtggtgaaatgcagtttaagggtttacacctataaaagagagacgggtatc
gtctgtttgtggtatgtacagagtgatattattgacacgcccggggcgacggatggtgatccccctggccagtgacgctgctgtcagataaagt

Figura 10A (cont.)

ctcccgtagaactttaccgggtggtgcataatcggggatgaaagctggcgcatgatgaccaccgatatggccagtggtccgggtctccgttatcgg
 ggaagaagtggtgatctcagccaccgcgaaaatgacatcaaaaacgccattaacctgatgttctggggaatataaatgtcaggctccctta
 tacacagccagtgctcaggtcgaccatagtgactggatatgttgtgtttacagtattatgtagtctgtttttatgcaaaatctaatttaatat
 tgatatttataatcattttacgtttctcgttcagctttctgtacaaagtggtagttcaggttaattaagctagcctagtccattgttcagtggttc
 gtagggctttccccactgtttggctttcagttatatggatgatgtggtagttgggggccaagtctgtacagcatcttgagtcctttttaccgctgt
 taccaattttcttttctgtttgggtatatacatttaaaccctaacaaaacaaagagatgggggtactctctaaattttatggggttatgtcattggatgt
 tatgggtccttgccacaagaacacatcatacaaaaaatcaaagaatgttttagaaaacttctattaacaggcctattgattgaaagtatgt
 caacgaattgtgggtcttttgggttttctgctccctttacacaatgtgggttatcctgctgtgatgcctttgtatgcatgtattcaatctaagcagg
 ctttcactttctcgccaacttacaaggcctttctgtgtaacaataacctgaacctttaccccggtgcccggcaacggccaggctgtgtccaagt
 tttctgacgcaacccccactggctggggcttggtcatgggcatcagcgcatgctggaacctttctggctcctctgccgatccatactgcgg
 aactcctagcgcgtgttttctcgcagcaggtctggagcaaacattatcgggactgataactctgtttctctatcccgcaaatatacatcgttt
 ccatggctgtaggctgtgtcgcaactggatcctgctgggagcgtctttgtttacgtcccgctggcgctgaatcctgaggacgacctttctcg
 gggctgctgggactctctcgtccctttctcgtctgccgttcgaccgaccagggcgacacctctttacgaggactccccgctgtgctctc
 tcatctgcccggaccgtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcgcatggagaccaccgtgaacgccaccacaaatattgccaaggtcttacata
 agaggactctggactctcagcaatgtcaacgaccgaccttgaggcatacttcaaagactgtttgtttaaagactgggaggagtgggggag
 gagattaggttaaaggctttgtactaggaggctgtaggcataaattgtgtctgcgaccagcaccatggcgcaatcactagagcgggggtacct
 ttaagaccaatgacttacaaggcagctgtatagcttagccactttttaaaagaaaagggggactggaagggttaattcactcccaacgaag
 acaagatctgttttctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagc
 ctcaataaagcttgcttgagtgctcaagtagtggtgctgctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagaccttttagcagtggt
 ggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattatcagttattataaacttgcaagaaatgaatatcagagagttagaggaaactgtt
 tattgagcttataatgggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcattttttcactgcatcttagttgtgtgtgtccaa
 actcatcaatgtatcttatcatgtctggtcttagctatcccgccttaactcgcctatcccgccttaactcgcctcagttccgctctccg
 ccccatggctgactaattttttttatgtatgagagccgaggccggtatcccttgagtggtttcatcctggagcagactttgagctgtggact
 gcaacacaacattgcctttatgtgtaactctggctgaagctcttacaccaatgtctgggggacatgtacctccaggggccagggaagactac
 gggagggtacaccaacgtcaatcagaggggctgtgtagctaccgataagcggaccctcaagagggcattagcaatagtgtttataaggcc
 ccctgttaattctgaagcgaaggccctgtgatcgcctattttataggttaattgtcatgataaataaggtttcttagacgtcaggtggc
 acttttcggggaaatgtgcgcggaaacccctattgtttatttttaataatcatcaaaatgtatccgctcatgagacaataacccgtataaat
 gcttcaataatattgaaaaagggaagagtatgagtattcaacatttcggtgcgccttattccctttttgcggtatttgccttctgttttgc
 acccagaacgcgtggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatgaactggtatctcaacagcggtaagat
 ccttgagagtttgcggcgaaagacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccggtgtgacgaggc
 aagagcaactcggctgcgcgcatacactattctcagaatgactgtgtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttaggatggcatgaca
 gtaagagaattatgagtgctgcatataacatgagtgataaacctgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaa
 ccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataaccaaacgagcgtgac
 accagatgctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaaactggcgaaactacttactctagcttccggcaacaattatagactgg
 atggaggcggataaagttgcaggaccactctgcgctcgcccttcgggctggctgtttattgtgataaatctggagccggtgagcgtggg
 tctcgggtatcattgagcactggggccagatggtaagccctcccgatctgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaa
 cgaatatagacagatcgtgagataggtgctcactgattgaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaa
 aacttcatttttaattaaaaggatcagggtgaagatccttttggataatctcatgacaaaalcccctaacgtgagtttctgttccactgagcgt
 cagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgctgaatctgctgcttgcacaaaaaaaaccaccgctaccag
 cggtgtgtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagt
 gtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagaccgcctacatacctcgtctgtaactcctgttaccagtggtgctgctcagtggtg
 gataagctgttcttaccgggttgagctcaagacgatagttaccggataaaggcgagcggtcgggctgaacggggggttcgtgacacagcc
 cagcttgagcgaacgacctacacgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaagcgccacgcttccgaaggagaaaggcgga
 caggatccggtgaagcggcagggtcggaacaggagagcgacaggggagcttcagggggaaacgcctgtgtatctttatagctcgtcggg
 tttccacctctgacttgagcgtcgatftttgtgtgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgcagcaacgcggcctttttacgggt

Figura 10A (cont.)

tctggccttttgctggccttttgaagcgtcccigatgggtcgtcatctacctgccctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgccg
ccggaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgtcg

Figura 10B

pCIGO-VSV.G (VSVG) (SEQ ID NO:36)

gtcgcagcatcgaggagatcaattccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtcggcgacgtagtcatgcccc
 gcgcccaccggaaggagctgactgggtgaaggctctcaaggcatcggtcgatgcaggaaaaggacaagcagcgaaaattcacgcccc
 ttgggaggtggcgcatatgcaaaggatagcactccactctactactgggtatcatatgctgactgtatgcatgaggatagcatatgcta
 cccggatacagattaggatagcatatactaccagatatagattaggatagcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgctaccc
 agatataaattaggatagcatatactaccagatatagattaggatagcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgctacccaga
 tatagattaggatagcatatgctaccagatatagattaggatagcatatgctaccagatatattgggtagtatatgctaccagatataaatt
 aggatagcatatactaccctaattcttattaggatagcatatgctaccggatagcagattaggatagcatatactaccagatatagattagg
 atagcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgctaccagatataaattaggatagcatatactaccagatatagattaggata
 gcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgctaccagatatagattaggatagcatatgctaccagatatattgggtagtatatgc
 taccatggcaacattagcccaccgtgctctcagcgacctcgtgaatatgaggaccaacaaccctgtgctggcgctcaggcgcaaggtgtg
 taatttgcctccagatcgagcaatcgccccctatcttggccgcccactctatgtaggtattccccgggtgcccattagtggtttgtg
 gcaagtgggttgaccgcagtggttagcggggttacaatcagccaagtattacacccctattttacagtcacaaaaccgaggcgcggtgtg
 gggctgacgcgtgccccactccacaatttcaaaaaaagagtggccactgtcttgtttatgggccccattggcggtggagccccgttaatt
 ttccgggggtgttagagacaaccagtgagtcgctgtgtcggtccactctcttccctgtttacaatatagagtgaacaacatggtcac
 ctgtcttgggtccctgctgggacacatcttaataacccagtatcatattgactaggattatgtgttcccatagccataaattcgtgtgagat
 ggacatccagctctttacggcttgtccccacccatgggafttctattgttaaagatattcagaatgtttcattcctacactagtattattgccaa
 ggggtttgtgagggttatattggtgtcatagcacaatgccaccactgaacccccgtccaaattttattctggggcgctcacctgaaacctgtt
 ttgagcacctcacatacaccttactgttcacaactcagcagttattctattagctaaacgaaggagaatgaagaagcaggcggaagattcag
 gagagttcactgcccgtccttgatcttcagccactgcccgtgtgactaaaatgggttactacccctcgtggaatcctgacccatgtaaataaa
 accgtgacagctcatgggggtgggagatatcgtgttcttaggaccttttactaacctaattcgatagcatatgctcccgttgggtaacata
 tgctattgaattagggttagtctggatagtatatactactaccgggaagcatatgctacccgtttagggttaacaagggggccttataaacac
 tattgtcaatgcccctcttgagggtccgcttatcggtagctacacaggccccctctgattgacgttgggtgtagcctcccgtagcttctctgggccccct
 gggaggtacatgtccccagcattgtgtgaaggagcttcagccaagagttacacataaaggcaatgtgtgtgtagtcacagactgcaaag
 tctgctccaggtgaaagccactcaagggafttcaatattggccattagccatattattcattggttataagcataaatcaatattggctatt
 ggccattgcatacgttcttatctatataatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgcatgttggcattgattattgactagtta
 ttaatagtaatacaattacgggggtcattagttcatagcccatatattggagttccggttacataactacggttaaattggccgctggctgaccg
 cccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggaactttccattgacgtcaatgggtggagatt
 tacggttaaactgcccacttggcagtagcatcaaggtatcatatgccaagtcgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgctggc
 attatgcccagtagacgttacgggactttctacttggcagtagcatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatcggttttggcagt
 acaccaatggcggtgtagcggttggactcacggggtttccaagtcctccacccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccaaaatca
 acgggactttccaaaatgtcgtataaacccgccccgttgacgcaaatggggcgttaggctgtacgggtgggaggtctatataagcagagctc
 gtttagtgaaccgtcagatcactagaagctttattgcggtagttatcacagttaaattgctaacgcagtcagtgcttctgacacaacagctcgc
 aacttaagctgcagaagttggtcgtagggcactgggcaggtaagtatacagggttacaagacagggttaaggagaccaatagaaactgggct
 tgtcgagacagagaagactcttgcgttctgataggcacctattggtcttactgacatccactttgctttctccacaggtgtccactcccagt
 tcaattacagctcttaaggctagtagtacttaatacactcactataggctagcggtaccgagctcggtaccatagtaacggccgcccagtggtg
 ctggaattcaacagagatcgatctgttcttgacactatgaagtgcctttgtacttagccttttattcattggggtgaattgcaagttcccat
 agtttttccacacaacaaaaaggaaactggaaaaatgttctctaaftaccattattgcccgtcaagctcagattaaattggcataatgac
 ttaataggcacagccatacaagtcaaaatgcccaagagtcacaaggctattcaagcagacgggttggtgtgtcatgcttccaaatgggtcac
 tacttgtgatttccgctgggtatggaccgaagtataaacacagtcacatccgatccttactccatctgtagaacaatgaaggaaagcattgaa
 caaacgaaacaaggaaacttggctgaatccaggcttccctcctcaagttgtggatagcaactgtgacggatgccaagcagtgattgtcca
 ggtgactcctcaccatgtgctggttgatgaatacacaggagaatgggttgattcacagttcatcaacggaaaatgcagcaattacatatgcc
 cactgtccataactctacaacctggcattctgactataagggtcaagggtatgtgattctaacctcatttccatggacatcaccttcttcag

Figura 10B (cont.)

aggacggagagctatcatccctgggaaaggaggggcacagggttcagaagtaactactttgcttatgaaactggagggaaggcctgcaaaat
gcaatactgcaagcattggggagtcagactcccatcagggtgtctggttcgagatggctgataaggatctctttgctgcagccagattccctga
atgcccagaagggtcaagtatctctgctccatctcagacctcagtggtatgaagcttaattcaggacgttgagaggatcttggaattattccctct
gccagaacactggagcaaaatcagagcgggtcttccaatctctccagtggtatctcagctatcttgctcctaaaaaccagggaaccggctctg
ctttaccataatcaatgggtaccctaaaatactttgagaccagatacatcagagtcgatattgctgctccaatctctcaagaatggctggaat
gatcagtggaactaccacagaaagggaactgtgggatgactgggcaccatatgaagacgtggaattggaccaatggagttctgaggacc
agttcaggatataagtttctttatcatgattggacatggtatgttggactccgatcttcatcttagctcaaaggctcaggtgttcgaacatcct
cacattcaagacgctgcttcgcaacttctgatgatgagagtttatttttgggtgatactgggctatccaaaaatcaatcagagcttgtagaagg
ttggtcagtagttggaagactctattgctctttttctttatcataggggttaatcattggactattcttgggttctccgagttggtatcatctttg
cattaaattaaagcacaccaagaaaagacagatttatacagacatagagatgaaccgacttggaaagtaactcaaatcctgcacaacagat
tcttcatgtttggaccaaatcaactgtgataccatgctcaagaggcctcaattataattgagtttttaattttatggaattctgcagatacca
tcacactggcgccgctcagcatcagtagaggccctattctatagtgacacaaatgctagagctcgtgatcagcctcagctgtgcct
tctagttgccagccatctgtttgtttgccccctcccgctgcttccctgaccctggaaagggtccactccactgctcttccataaaatgaggaa
attgcatcgcaattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcag
gcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaagaaccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtt
tgctgattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcgtcgttccgctgcggcgagcggtatcagctcactcaagcggtga
atagcgttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgc
gttgctggcggttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgcacaggactat
aaagataccaggcggttcccccgtgaagctcctcgtcgtcctcgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttctcccttcgg
gaagcgtggcgctttctcaatgctcagctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcggtcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgtt
cagcccagccgctgcgcttaccggttaactatcgtctgagtcacacccggtgaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaac
aggattagcagagcgaggtatgtaggcggtctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagatttgggtat
ctgcgtctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccacgctggtagcggtgtttttgttt
gcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatcacaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaaactca
cgttaaagggttttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtata
tgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctgctcatcatagttgcctgactccc
cgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattt
atcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgagcaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagctatttaattgttgcggg
aagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgaacgttgttgcattgtctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggtaggt
tcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgt
cagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtga
ctggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatcgggataataccgcgccac
atagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaaacttcttggggcgaaaaactcgaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgta
accactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttaccagcggttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaa
gggaataaaggcgacacgggaatgttgaatactcactcttcttttcaafattatgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggat
acatattgaatgtatttagaaaaataaacaatatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgcacactgac

Figura 11A

PLV4301G38A1 (también denominado como pLV4301G PDLV scFV 38A1) (SEQ ID NO:37)

cgataaccctaattcgatagcatatgcttccgftgggtaacatatgctattgaattagggttagtctggatagtatatactactaccgggaa
gcatatgctaccgfttaggggttcaccgggtgatccggccacgatcgctccggcgtagaggatctaattgtgagtttagctactcattaggcacc
ccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacatgattac
gccaaagcgcgaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactctttagtcttgaaca
tggtaacgatgagtttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagtgaagggtgacgatcgctccta
ttagggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgattgcagagataattgtatttaagtccttagctcgatac
ataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctgctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctt
gagtgcttaagtagtgtgcccgtctgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaaaatctctagcagt
ggcggccgaacaggagacttgaaggcgaagggaacacagaggagctctctcgacgcaggaactcggcttctgaaggcgcgcacgggaaga
ggcgaggggcgcgactggtagtgagtcgcaaaaaattttagctagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagagcgtcagtttaag
cgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggftaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaacatatagtatgggcaagc
agggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacctccctca
gacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacctctattgtgtcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaa
gcttttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaagtgaagaccacccgcagcaagcggcggctgatcttcagacctggaggaggagata
tgagggacaattggagaagtgaattatataataaagttagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaaaagagaagag
tggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagctttgttcttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaat
gacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaatttctgagggtctattgaggcgcaacagcatctgtt
gcaactcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgg
gggtgctctgaaaaactcatttgaccactgctgtccttggaaatgctagttggagtataaatctctggaacagatttggaaacacagacct
ggatggagtgaggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaaaatgaac
aagaattattggaaatagataaatgggcaagtttgggaattgggttaacatacaaaattggctgtgttatataaattattcataatgatagt
aggaggcttggtagggttaagaatagttttgctgtactttctatagtgatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacc
tcccaaccccgaggggaccgcagggcccgaaggaaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaac
ggatctcgacgggtatcggttttaaaagaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaaacaaattcaaaaatttcaaaattttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagacccc
acctgtagggttggcaagctagcttaagtaacgccatttgcaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaagggtta
ggaaacagagagacagcagaatatgggccaacaggatatctgtgtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatgggtcccc
agatgcgggtcccgcctcagcagttttagagaacatcagatgtttcagggtgccccaggacctgaatgacctgtgccttatttgaact
aaccaatcagttcgtctcgttctgttctgcgcgcttctgtcctccgagctcaataaaagagcccacacccctcactcggcgcgcagctct
ccgatagactgcgtcgggggtaccgatcaccaactttgtacaaaaagctgaacgatatcgccacctggggcagcacagccattctgg
ccctgctgctggcagtgctgcagggcggtgcagctGaagtgacagctgggtggaatctggcggcggactgggtgagcctggcggtatcttgaga
ctgagctgtgcggcagcggcttcaccttcagcaactacgcatgagctgggtgcgcagggccctggaaaaggcctggaaatgggtgtccac
catcagcggctctggcggaaccacctactacgcgatagcgtgaaggcggttcacctctccgggacaacagcaagaacacctgtac
ctgcagatgaacagcctgcgggtggaagataccggcgtgtactactgcgccaaggactggttcagaagcagcagccccgacgccttcgaca
tctggggccagggaacaaccgtgacctgtctgtggcgaggcggtatcaggcgggaggatcaggggaggcggaagcggagcacctt
cttacgtgctgaccagccccctagcgtgtcagtggtcctggacagaccgccagaatcacctgtggcggaacaacatcgccggaagatc
gtgactggtatcagcagaggccggacaggctccgtgctcgtgatctactacgacacagacagacctgcggcatccccgagagattcag
cggcagcaacagcggcaacatggccacctgacctcagcacagtgggagcggcgagggccgactactactgtcaagtgtgggacac
cggcagcgtacacgtggtgttggaggcggcaccaagctgacagtgctggccccggcggaactttgtatacaaaagttgcagcgagagc
aagtacggccctccctgcccccttgcctgccccgagttcctggcgagccacagcgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctga
tgatcagccggacccccgaggtgacctgtgtggtggtgacgtgtccaggaggacccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtg
gaggtgcacaacgccaagaccaagccccgggaggagcagttcaatagcacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgtgtcaccaggact

Figura 11A (cont.)

ggctgaacggcaaggaatacaagtgttaagggtccaacaaggccctgccagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggccag
 cctcgggagccccaggtgtacacctgccccctagccaagaggagatgaccaagaatcaggtgtccctgacctgctggtgaagggttcta
 cccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggcag
 cttcttctgtacagcaggtgacctggacaagagccggtggcaggagggaacgtcttttagctgctccgtgatgcagcaggccctgcaca
 accactacaccagaagagcctgtccctgagcctgggcaagatgttcagatcttgtatattacatctgggcacccctggccggaatctgcgt
 ggcccttctgctgtcttgcctcatctctctacggctccaccagcggctccggcaagcccggtctggcgagggtccaccagcggc
 gactacaaggacgacgatgacaagtaataggatatcggttcagcttctgtacaaagtgggattcgagttaattaagttaacgaattcccc
 cctctccctccccccccctaactgttactggccgaagccgcttggaaataagccgggtgtcggttcttatatgttatttccaccatattgccg
 tcttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctgacgagcattctaggggtcttccccctctcgccaaaggaaatgcaaggctt
 gttgaatgtcgtgaagggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaacccccac
 ctggcgacaggtgctctcggccaaaagccacgtgtataagatacactgcaaaaggcggcacaacccagtgccacgttgtgagttggata
 gttgtggaagagtgcaaatggtctctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggatccccattgtatgggatctgatctg
 gggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccgaaaccaggggacgtggttcttggaaaaac
 acgatgataatattggccacaacctgggagggcggaagcggcgagggtccccctcagggcaccatggtgagcaaggcgaggagctgttca
 ccggggtggtgcccctcgtgctgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggggcgaggcgatgccaccta
 cggcaagctgacctgaagttcatctgacaccgggaagctgcccgtgcccctggcccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagt
 cttcagccgtacccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgcatgccgaaggctacgtccaggagcgacacattcttctcaa
 ggacgacggcaactacaagacccgcgcgaggtgaagttcgaggggcgacacctgggtgaaccgcatcgagctgaaggcgatcgacttcaa
 ggaggacggcaacatctggggcacaagctggagtacaactacaacggccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcat
 caaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcgggcagcg
 ccccgctgctgcccgaacacactacctgagcaccagtcggccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgg
 agttcgtgaccgcccgggatcactctcggcagtgagcgtgtacaagtaacgctccgggtctagagctagcgttaccatgcattacgt
 agtcgacgacttaattaagctagcctagtgccattgttcagtggttcgtaggggttccccactgtttggcttccagttatatggatgatgtgg
 tattgggggccaagctgtacagcatcttgagtccttttaccgctgttaccatttcttcttgggtatataattaaaccttaacaaaac
 aaagagatgggggtactcttaaatfttatgggttatgtcattggatgttatgggtccttgcacaagaacacatcataaaaaaatcaaaga
 atgttttagaaaacttctattaacaggcctattgattggaagtatgtcaacgaattgtgggtcttttgggtttgctgcccctttacacaatgt
 ggttatctgctgtatgctttgtatgcatgtattcaatcaagcaggtttcactttctcgcaacttacaaggcctttctgtgtaacaatacc
 tgaacctttacccgttgcccggaacggccagggtctgtgccaagtgttctgacgcaacccccactggctggggttggtcatggccatca
 gcgatgcgtggaaccttttggctcctctgcccgatccatactgcggaactcctagccgcttgtttgctcgacagcaggtctggagcaaacatta
 tcgggactgataactctgttctctatcccgcaaatatacatgtttccatggctgtaggctgtgctgccaactggatcctgcggggacgtcc
 tttgtttacgtcccgctggcgctgaatcctgcggacgaccttctcggggtcgcttgggactctctcgctcccccttctcgctgcccgtccgaccg
 accacggggcgacacctctcttaccgaggactccccgtgtgcttctcatctgcccggaccgtgtgacttgccttccacctgacgctgcagt
 gagaccaccgtgaacgcccaccaaataattcccaaggctttacataagaggactcttggactctcagcaatgtcaacgaccgaccttgaggc
 atacttcaaagactgtttgtttaagactgggaggagttgggggaggagattaggttaaaggctttgtactaggaggctgtaggcataaatt
 ggtctgcgaccagcaccatggcgcaatcactagagcgggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttt
 aaaagaaaaagggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctggttagaccagat
 ctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacctgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtcccgtctg
 ttgtgtactctggaactagagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaaatcttagcagtagtagtcatgtcatctattattcagtat
 ttataacttgcaagaaatgaatatcagagagtgagaggaactftgtattgacgttataatggttacaataaagcaatagcatcacaat
 ttcacaaataaagcatttttctactgcattctagtgtgtgttgcacaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatccccccct
 aactccgcccacccccctaactccgcccagttccgcccattctccgcccattggctgactaatttttttatttatgagaggccgaggccg
 gatcccttgagtggttctatcctggagcagactttgcagctgtggactgcaacacaacattgcctttatgtgtaactcttggctgaagctctta

Figura 11A (cont.)

caccaatgctgggggacatgtacctccagggggcccaggaagactacggggaggctacaccaacgtcaatcagaggggcctgtgtagctacc
 gataagcggaccctcaagagggcattagcaatagtglttataaggcccccttgtaattcttgaaagcgaaggccctcgtgatacgcctatt
 tttataggtaatgtcatgataataatgggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctattgtttattttctaa
 atacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaagggaagagtatgagtattcaacatttc
 cgtgtcgccttattcccttttttgcggcattttgccttctgttttgcctcaccagaaaacgctgggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttg
 ggtgcacgagtggggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgcgccgaagaacgttttccaatgatgagcact
 tttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacccgggcaagagcaactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttgg
 ttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgcccataaccatgagtataacact
 gcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagcgaaccgcttttllgcacaacalgggggatcatglaactcgccttgatcgt
 tgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttcgcaaacctatta
 actggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgtcgcggccctt
 ccggctggcgtggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcc
 cgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagca
 ttggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatlttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgat
 aatctcatgaccaaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacccctagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttt
 tctgcgtaatctgctgcttgcaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgtttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaag
 gtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagttagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcct
 acatacctcgtctgtctaatctgttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccgg
 ataaggcgcagcgggtcgggtgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagc
 gtgagcattgagaaaagcgcacgttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacg
 agggagcttcagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgcacacctgacttgagcgtcgtattttgtgatgctcgtcagg
 gggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttctggccttttgcctggttttgaagctgtccctgatggctgcat
 ctacctgcctggacagcatggcctgcaacgcggcatcccgatgcgcccgaagcgagaagaatcataatgggggaaggccatccagcctcg
 cgtcg

Figura 11B

PLV4301G19H9 (también denominado como pLV4301G PDLV scFV 19H9) (SEQ ID NO:38)

cgataaccctaattcgatagcatatgcttcccggtgggtaacatatgctattgaattagggttagtctggatagtataactactaccgggaa
gcatatgctaccggttaggggtcaccgggtgatccggccacgatgcgtccggcgtagaggatctaattgtaggttagctcactcattaggcacc
ccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcgggataacaatttcacacaggaaacagctatgacatgattac
gccaaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactctgtagcttgaaca
tggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcacccgtgcatgccgattgggtggaagtgaagggtggtacgatcgtgcctta
ttaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgattgcagagataattgtatttaagtcctagctcgatac
ataaacgggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcctt
gagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaatactctagcagt
ggcgcccgaacagggaacttgaagcgaaagggaacacagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgcgtaagcgcgacaggcaaga
ggcgaggggcgagctggtagtgcgcaaaaatttgcactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtttaag
cgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagc
agggagctagaacgattcgagtttaactctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttca
gacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacccctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaa
gcttttagacaagatagaggagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagata
tgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagagaagag
tggtgcagagagaaaaagagcagtgagggaataggagcttcttcttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgcgagcgtcaat
gacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcgacgacgagaacaatttgcgagggtattgaggcgcaacagcatctgtt
gcaactcacagctctgggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgg
gggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtccttgggaatgctagttggagtaataaactcttggaaacagatttggaaacacagacct
ggatggagtgaggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaac
aagaattattggaattagataaatgggcaagtttgggaattgggttaacatacaaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagt
aggaggcttggtagggttaagaatagtttttctgtactttctatagtgaaataggttaggcaggagatattcaccattatcgtttcagaccacc
tcccaaccccgaggggaccgacaggcccgaaggatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaac
ggatctcgacggtatcggttttaaaagaaaagggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatttatcgattttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaagacccc
acctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtta
ggaaacagagagacagcagaatatgggcaaacaggatatctgtgtaagcagttcctgccccggctcaggggcaagaacagatgggtccc
agatgcgggtccgcccctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgccttatttgaact
aaccatfcagttcgttctcgtctgttctgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacacccctcactcggcgccgagctct
ccgatagactcgtcgccgggtaccgatataccaactttgtacaaaaagctgaacgatatacgccaccatgggcagcacagccattctgg
ccctgctgctggcagtgctgcaggcggtgtcagctGaagtgcagctgtgggaatctggcgggcggactgggtcagcctggcggaatcttgaga
ctgagctgtgcccagcgggttacccttcagcaactacgcatgagctgggtgcccaggccctggaaaaggcctggaattgggtgtccac
catcagcggtcttggggaaccactactacgcccgatagcgtgaaggcgccgttcacatctccgggacaacagcaagaacacctgtac
ctgcagatgaacagcctcggggtggaagataccgctgtactactgcgcaaggactggttcagaagcagcagccccgacgcttcgaca
tctggggccagggaacaaccgtgaccgtgtctgtggcgaggcggtatcaggcgggaggatcaggggagggtggaagcgaggcacctt
cttacgtgctgacccagccccctagcgtgtcagtggtcctggacagaccgccagaatcacctgtggcggaacaacatcgccgggaagatc
gtgactggtatcagcagaggcccgacaggctcccgtgctgctgactactacgacacgcagacctgcggcatccccgagagattcag
cggcagcaacagcggcaacatggccacctgacctcagcacagtgggagccggcgacgaggccgactactactgtcaagtgtgggacac
cggcagcagatcacgtgggtgttggaggcggaaccaagctgacagtgtggggcccgccgggcaactttgtatacaaaagttgcagcgagagc
aagtacggccctccctgcccccttgcctgcccccgagttcttggcgggaccagcgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctga
tgatcagccggacccccgaggtgacctgtgtgtgtgtgacgtgtccaggaggacccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcggtg

Figura 11B (cont.)

gaggtgcacaacgccaagaccaagccccgggaggagcagttcaatagcacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggact
 ggctgaacgggaaggaatacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgccagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggccag
 cctcgggagccccagggtgtacacctgccccctagccaagaggagatgaccaagaatcaggtgtccctgacctgctggtaagggtctta
 cccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggcag
 ctcttctctgtacagcaggctgaccgtggacaagagccgggtggcaggagggaacgtcttttagctgctccgtgatgcacgaggccctgcaca
 accactacaccagaagagcctgtccctgagcctgggcaagatgttcagatcttgtgatattacatctgggcacccctggccggaatctgct
 ggcccttctgctgctctgatcatctctctctgctacggctccaccagcggtccggcaagcccggtctggcgagggtccaccagcggc
 gactacaaggacgacgatgacaagtaataggatctggttcagcttcttctgtacaaagtgggattcgagtaattaagtaacgaattcccc
 ccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaaataaggccgggtgtcggtttgtctatatgttattttccaccatattgccg
 tcttttggcaatgtgaggggcccgaaacctggccctgtcttctgacgagcattcttaggggtctttccccctctcgccaaaggaatgcaaggtct
 gttgaatgtctggaaggaagcagttcctctggaagcttctggaagcaaacacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccac
 ctggcgacaggtgcctctgcccgaagccacgtgtataagatacacctgcaaaaggcgccacacccagtgccacgttgtgagttggata
 gttgtggaaagagtcgaatggctctctcaagcgtattcaacaagggtgctgaaggatcccagaagggtacccattgtatgggatctgatctg
 gggcctcggtgcacatgctttacatgtgttttagtcgagggttaaaaaacgtctagggcccccgaaaccaggggacgtggttttctttgaaaaac
 acgatgataataatggccacacccatgggagggcgggaagcgggcgagggtccctcgaggcaccatgggtgagcaaggggcaggagctgttca
 ccgggggtggtgccatcctggtcgagctggacggcgacgttaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggggcgaggggcgatgccacct
 cggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccgggaagctgcccgtgcccctggccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagt
 cttagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgacccatcttctca
 ggacgacggcaactacaagaccgcccggagggtgaagttcgaggggcgacacccctggtgaaccgcatcgagctgaaggggcatcgacttca
 ggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcat
 caaggtgaactcaagatccgccaacacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacgg
 cccgtgctgctgcccgaacacactacctgagcaccagctccgctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtctgctgg
 agttcgtgaccgcccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaacgctcccggtctagagctagcggtaccatgcattacgt
 agtcgacgacttaattaagctagcctagtgccatttggcagtggttcgtaggggtttccccactgtttggcttccagttatatggatgatggg
 tattgggggccaagtctgtacagcatcttgagtcctttttaccgctgttaccatatttcttttctttgggtatatacattaaacctaacaaaac
 aaagagatgggggtactctctaaatttatgggttatgtcattggatgttatgggtccttgcacaagaacacatcatacaaaaaatcaaaga
 atgttttagaaaacttctatttaacaggcctattgattggaagatgtcaacgaattgtgggtcttttgggttttctgctcccttttacacaatgt
 ggttatcctgctgtgatcccttctgtatgcatgtattcaatcaagcaggctttcactttctcgccaactacaaggcctttctgtgtaacaatacc
 tgaacctttacccgttgcgggcaacggccaggtctgtgccaagtgttctgacgcaacccactggctggggctgggtcatggccatca
 gcgcatgctggaaccttttggctcctctgcgacccatctgcggaactcctagccgtgttttctgcgacgaggtctggagcaaacatta
 tcgggactgataactctgttgcctatcccgaatatacatcgtttccatggctgtaggctgtgctgccaactggatcctgcgaggacgtcc
 tttgttacgtcccgctggcgctgaatcctgcggacgaccttctcggggtcgcttgggactctctgctcccttctccgtctccgttccgaccg
 accacggggcgacacctcttttacgggactccccgtctgtgcttctcatctgcggaccgtgtgcacttgccttccctctgcacgtcgcatg
 gagaccaccgtgaacgcccaccaaataattgccaaggcttaccataagaggactcttgactctcagcaatgtcaacgaccgaccttgaggc
 atacttcaaagactgtttgttaagactgggaggaggtgggggaggagattagggttaaaggctttgtactaggaggcttaggcataaatt
 ggtctgcgcaccagcaccatggcgcaatcactagagcgggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttt
 aaaaagaaaagggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctggttagaccagat
 ctgagcctgggagctctctggttaactaggggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtccgctctg
 ttgtgtgactctggttaactagagatccctcagaccccttttagtcagtggtgaaaaatcttagcagtagtagttcatgtcatcttattttagtat
 ttataacttgcgaagaaatgaatatcagagagtgaagggaactgtttattgagccttataatgggtacaaataaagcaatagcatcacaat
 ttcacaaataaagcatttttttactgcatcttagttgtgtgttgcacaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatccgcccct
 aactccgccatcccggcctaactccggcagttccggccattctcgcccatggctgactaattttttttattatgcagaggccgaggccg
 gatcccttgagtggcttcatcctggagcagactttgagctgttgactgcaacacaacattgcctttatgttaactcttggctgaagctctta

Figura 11B (cont.)

caccaatgctgggggacatgtacctccagggggccaggaagactacgggaggctacaccaacgtcaatcagaggggcctgtgtagctacc
 gataagcggaccctcaagagggcattagcaatagtgtttataaggccccctgttaattctgaagacgaaagggcctcgtgatacgccattt
 tttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttttttctaa
 atacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagatagagtattcaacatttc
 cgtgtcgccttattcccttttttgcggcattttgccttccgtgttttgcctcaccagaaacgctgggtaaagttaaagatgctgaagatcagttg
 ggtgcacgagtggggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatcctgagagttttcggcccgaaagacgttttccaatgatgagcact
 tttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggctcggcgatacactattctcagaatgacttgg
 ttgagfactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtataacact
 gcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcttgatcgt
 tgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactatta
 actggcgaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgccctt
 ccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggttaagccctcc
 cgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagca
 ttgtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatctaggtgaagatccttttgat
 aatctcatgacaaaaatcccctaactgagttttcgttccactgagcgtcagacccgtagaaaaagatcaaaggatcttcttgatccttttt
 tctgcgcgtaatctgctgcttgcaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgtttgcccggatcaagagctaccaactcttttccgaag
 gtaactggcttcagcagagcgcagatacacaatactgtccttctagttagccgttagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcct
 acatacctcgtctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttacgggttggtgactcaagacgatagttaccgg
 ataaggcgcagcggctcgggtgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacccgaactgagatacctacagc
 gtgagcattgagaaagcgccacgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggctcggaaacaggagagcgacg
 agggagcttcagggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctgacttgagcgtcgattttgtatgctcgtcagg
 gggcgaggcctatggaaaaacccagcaacgcggcctttttacgggttctggccttttctggcctttttgaagctgtccctgatggtcgtcat
 ctacctgctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgcgcccgaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcg
 cgtcg

Figura 12

	19H9	38A1
Concentración de células (por mL)	3.23e6	2.99e6
Volumen	120 mL	120 mL
Células Totales	3.88E+08	3.59E+08
Concentración de aPDL1	31.76 ug/mL	20.20 ug/mL
aPDL1 Total (mg)	3.81	2.42
Capacidad de secreción (µg por 1e6 células)	9.82	6.75

Figura 13A

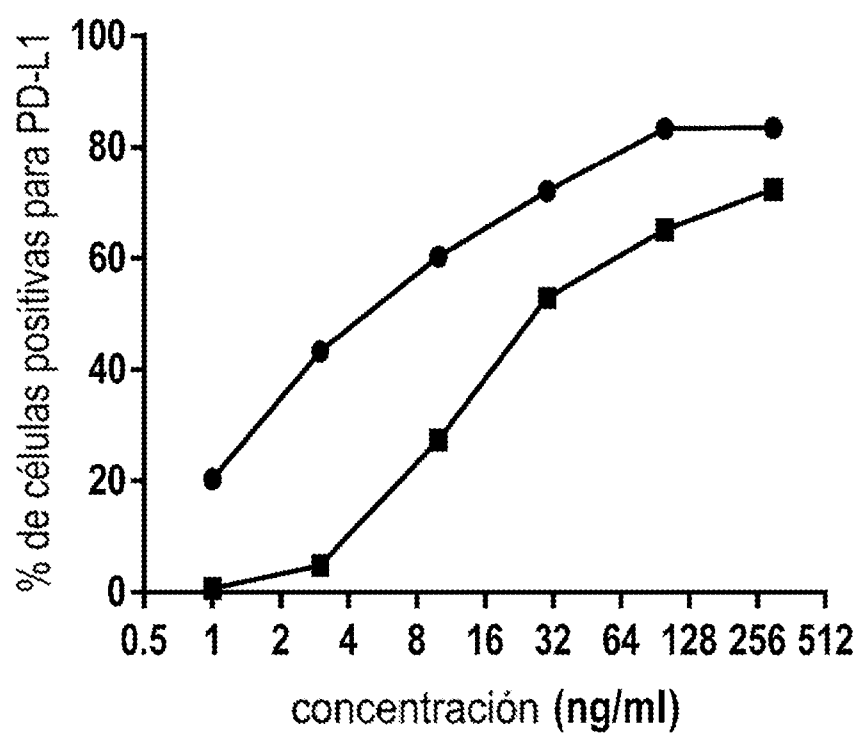


Figura 13B

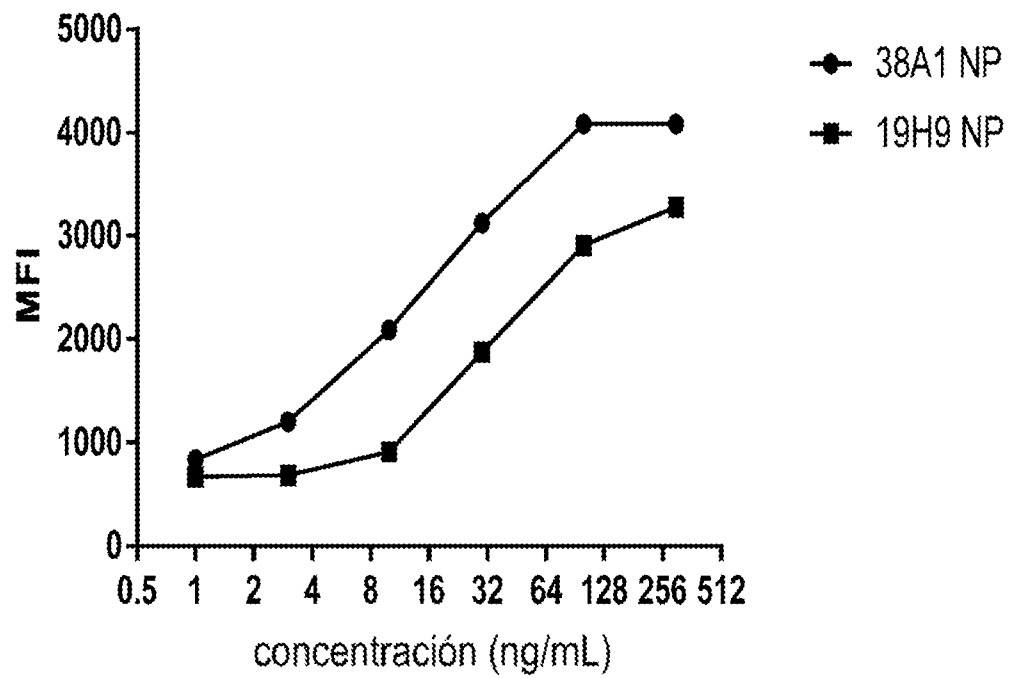


Figura 14A

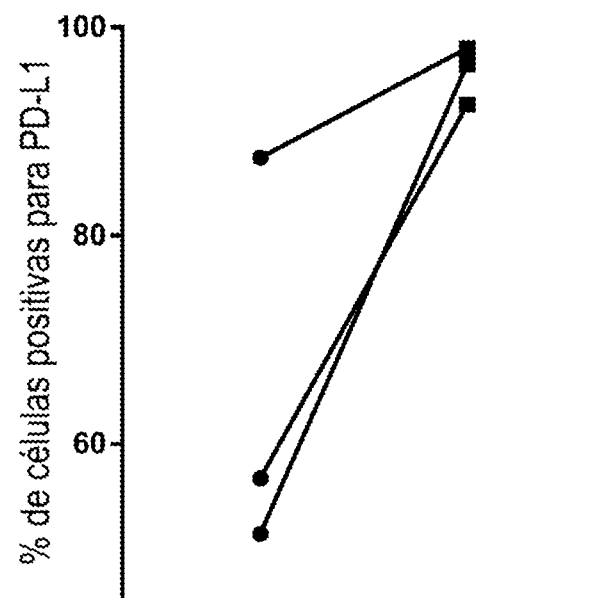


Figura 14B

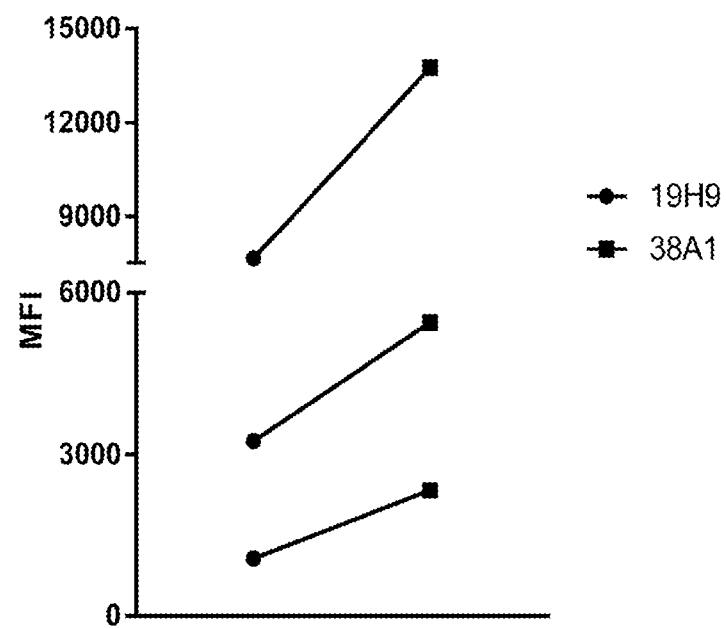


Figura 15A

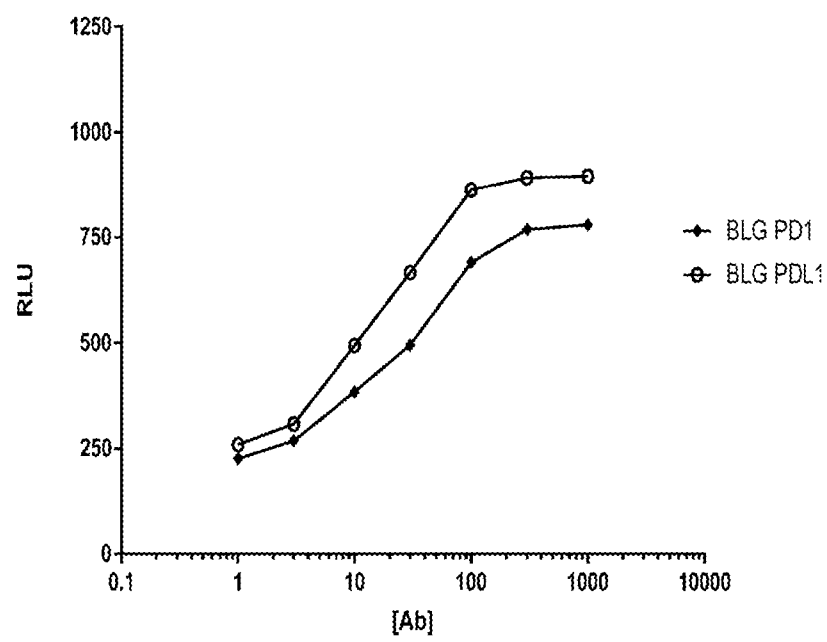


Figura 15B

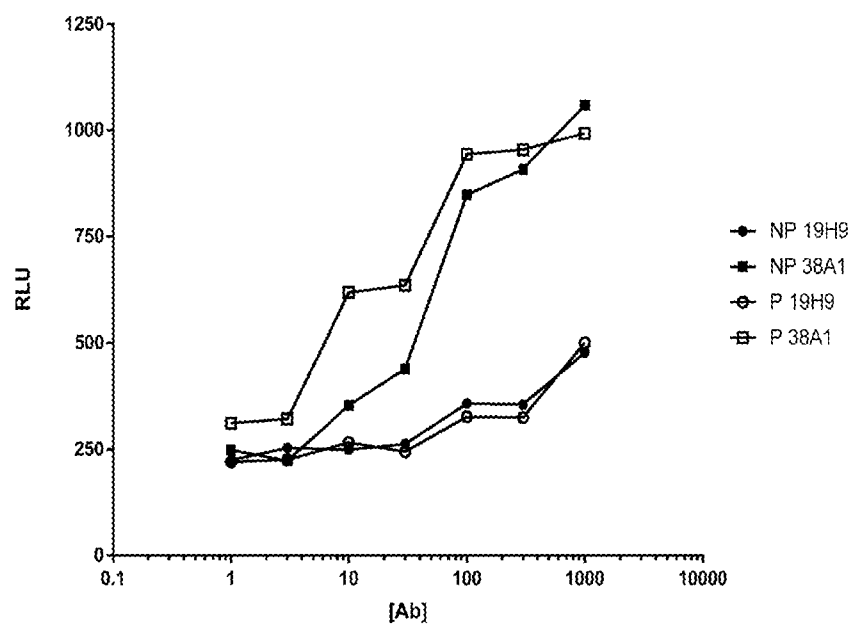


Figura 16A

pLV4301G PDLV scFV 38A1

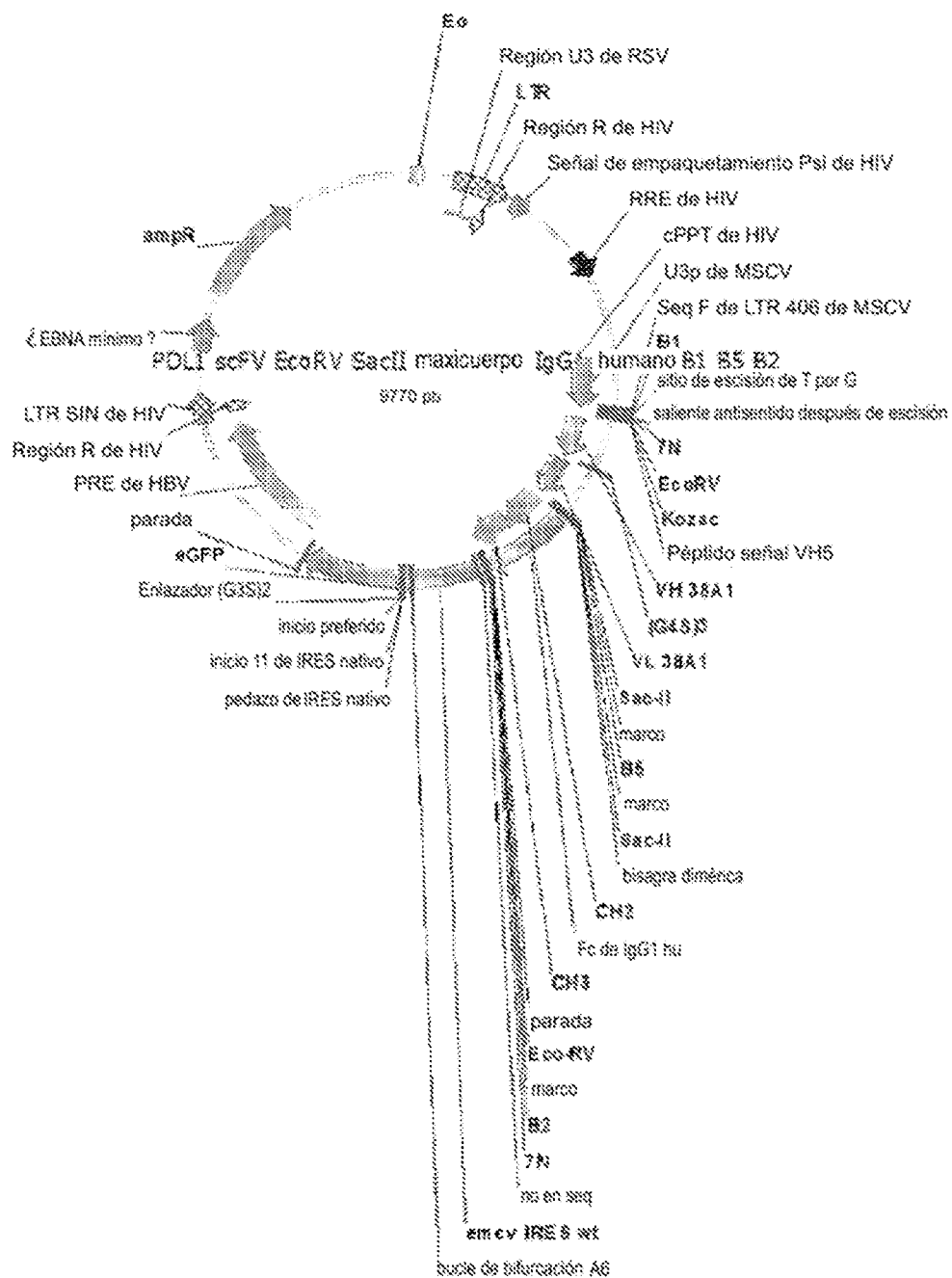


Figura 16B

pLV4301G PDLV scFV 19H9

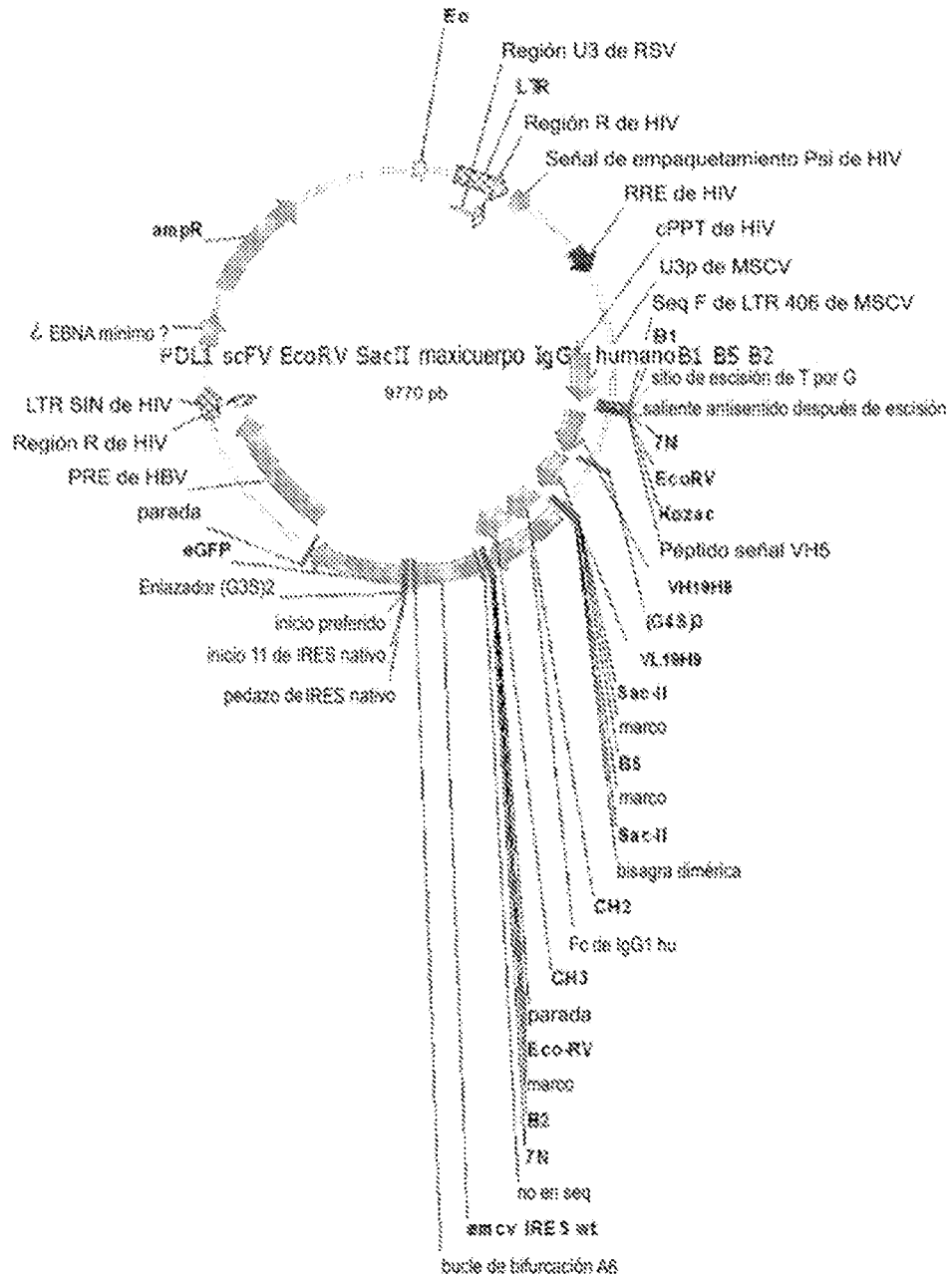


Figura 17

CH1																	
Índice EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S
Índice EU	138	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155
IgG1	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T
IgG2	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T
IgG3	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T
IgG4	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T
Índice EU	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176
IgG1	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S
IgG2	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S
IgG3	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S
IgG4	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S
Índice EU	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
IgG1	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	Q	T	Q	T
IgG2	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	N	F	Q	T	Q	T
IgG3	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	Q	T	Q	T
IgG4	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	Q	T	R	T
Índice EU	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218
IgG1	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K
IgG2	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	V	E	R	K
IgG3	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	L	K
IgG4	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S	K
Bisagra																	
Fc >																	
Índice EU	221			222	223	224	225	226	227	228							
IgG1	D			K	T	H	T	C	P	P							
IgG2				V		E		C	P	P							
IgG3	L	G	D	T	T	H	T	C	P	R	C	P	E	P	N	S	C
IgG4				T		E	P	C	P	S							
Índice EU																	
IgG1																	
IgG2																	
IgG3	F	C	P	R	S	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C
IgG4																	
Fc >																	
Índice EU												229	230	231	232	233	234
IgG1												C	P	A	P	E	L
IgG2												C	P	A	P	E	L
IgG3	E	P	H	S	S	D	T	P	P	R	C	P	R	C	P	A	P
IgG4												C	P	A	P	E	L

Figura 17 (cont.)

CH2																													
Índice EU	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257								
IgG1	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
IgG2	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
IgG3	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
IgG4	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P								
CH2																													
Índice EU	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278								
IgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y								
IgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y								
IgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y								
IgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y								
CH2																													
Índice EU	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299								
IgG1	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T								
IgG2	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T								
IgG3	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T								
IgG4	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	G	Y	N	S	T								
CH2																													
Índice EU	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320								
IgG1	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	G	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
IgG2	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	G	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
IgG3	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	G	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
IgG4	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	G	D	W	L	N	G	K	E	Y	K								
CH2																													
Índice EU	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340									
IgG1	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K									
IgG2	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K									
IgG3	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K									
IgG4	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K									
CH3																													
Índice EU	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361								
IgG1	G	G	P	R	E	P	G	V	Y	T	L	P	P	G	R	D	E	L	T	K	N								
IgG2	G	G	P	R	E	P	G	V	Y	T	L	P	P	G	R	D	E	L	T	K	N								
IgG3	G	G	P	R	E	P	G	V	Y	T	L	P	P	G	R	D	E	L	T	K	N								
IgG4	G	G	P	R	E	P	G	V	Y	T	L	P	P	G	R	D	E	L	T	K	N								
CH3																													
Índice EU	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382								
IgG1	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
IgG2	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
IgG3	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
IgG4	G	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E								
CH3																													
Índice EU	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403								
IgG1	S	N	G	G	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S								
IgG2	S	N	G	G	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S								
IgG3	S	N	G	G	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S								
IgG4	S	N	G	G	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S								
CH3																													
Índice EU	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424								
IgG1	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	G	G	G	N	V	F	S								
IgG2	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	G	G	G	N	V	F	S								
IgG3	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	G	G	G	N	V	F	S								
IgG4	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	G	G	G	N	V	F	S								
CH3																													
Índice EU	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445								
IgG1	C	S	V	M	H	E	A	L	N	N	H	Y	T	G	K	S	L	S	L	S	P								
IgG2	C	S	V	M	H	E	A	L	N	N	H	Y	T	G	K	S	L	S	L	S	P								
IgG3	C	S	V	M	H	E	A	L	N	N	H	Y	T	G	K	S	L	S	L	S	P								
IgG4	C	S	V	M	H	E	A	L	N	N	H	Y	T	G	K	S	L	S	L	S	P								
CH3																													
Índice EU	446	447																											
IgG1	G	K																											
IgG2	G	K																											
IgG3	G	K																											
IgG4	G	K																											