

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 647**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2016** **E 21155542 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024** **EP 3909972**

54 Título: **Proteínas de fusión PD-1-CD28 y su uso en medicina**

30 Prioridad:

19.06.2015 EP 15172913

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

06.08.2024

73 Titular/es:

KOBOLD, SEBASTIAN (50.0%)
Paulsdorfferstraße 17a
81549 München, DE y
ENDRES, STEFAN (50.0%)

72 Inventor/es:

KOBOLD, SEBASTIAN y
ENDRES, STEFAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 976 647 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 fusión PD-1-CD28 y su uso en medicina

- 5 La presente invención se refiere a células transducidas que portan moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican proteínas de fusión PD1-CD28 o que expresan las proteínas de fusión codificadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades particulares, así como una composición farmacéutica/medicamento que comprende dichas células transducidas que expresan las proteínas de fusión de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento de enfermedades, en particular en la intervención
10 médica de enfermedades caracterizadas por la expresión de PD-L1 y/o PD-L2.

La terapia adoptiva de células T (ACT) es una estrategia poderosa para tratar incluso las etapas avanzadas del cáncer metastásico (Rosenberg, Nat Rev Clin Oncol 8(10) (2011), 577-585). Para ACT, las células T específicas de antígeno se aíslan o modifican y se expanden *in vitro* antes de la reinfusión al paciente (Gattinoni y col., Nat Rev Immunol 6(5)
15 (2006), 383-393). En los ensayos clínicos, se han logrado tasas de respuesta sin precedentes en algunos pacientes con cáncer mediante ACT junto con irradiación corporal total. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no responden a este tratamiento (Dudley y col., J Clin Oncol 26(32) (2008), 5233-5239; Rosenberg y col., Clin Cancer Res 17(13) (2011), 4550-4557). La inmunosupresión inducida por tumores que no se contrarresta con irradiación corporal total se ha implicado en esta resistencia a la terapia (Leen y col., Annu Rev Immunol 25 (2007), 243-265). Recientemente,
20 receptores inhibidores regulados positivamente en células T activados y sus respectivos ligandos expresados dentro del medio tumoral han demostrado contribuir al fracaso de la terapia con células T (Abate-Daga y col., Blood 122(8) (2013), 1399-410). Entre los receptores inhibidores, el receptor de muerte programada 1 (PD-1) desempeña un papel central, dado que estudios recientes han identificado PD-1 expresado en células T específicos de antígeno tumoral en tumores (Gros y col., J Clin Invest (2014), 10.1172/JCI73639). La interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 suprime
25 la señalización de TCR y la activación de las células T y, por lo tanto, impide la activación efectiva tras el reconocimiento de la diana (Gros y col., J Clin Invest (2014), 10.1172/JCI73639; Yokosuka y col., J Exp Med 209(6) (2012), 1201-1217; Ding y col., Cancer Res (2014), 10.1158/0008-5472.CAN-13-3596; Karyampudi y col., Cancer Res (2014), 10.1158/0008-5472.CAN-13-2564). El peso clínico de estos mecanismos está subrayado por estudios terapéuticos que combinan ACT o células T modificadas genéticamente con el bloqueo de PD-1 basado en anticuerpos
30 que dan como resultado una marcada mejora de la actividad antitumoral (John y col., Clin Cancer Res 19(20) (2013), 5636-5646; Goding y col., J Immunol 190(9) (2013), 4899-4909). La aplicación sistémica de anticuerpos bloqueadores de PD-1 o PD-L1 tiene la desventaja de dirigirse potencialmente a células T de cualquier reactividad y, por lo tanto, de inducir efectos secundarios sistémicos (Topalian y col., N Engl J Med 366(26) (2012), 2443-2454; Brahmer y col., N Engl J Med 366(26) (2012), 2455-2465). Además, ACT por sí mismo conlleva un riesgo considerable de toxicidad,
35 como se observó recientemente en los estudios de fase I (Linette y col., Blood 122(6) (2013), 863-871; Morgan y col., J Immunother 36(2) (2013), 133-151). La combinación con el bloqueo indiscriminado de PD-1 conlleva el riesgo de potenciar los efectos secundarios de cualquiera de las terapias solas. Una estrategia potencial para perseguir el bloqueo de PD-1-PD-L1 sin activación no selectiva de células T es limitar su efecto a las células T reactivas tumorales. Se ha demostrado la compatibilidad principal de la señalización entre un dominio extracelular de CD28 y un dominio
40 intracelular de PD-1 (Riley y June, Blood (2005), 105(1), 13-21; Chemnitz y col., J Immunol 173(2) (2004), 945-954). Además, la compatibilidad de CTLA-4, PD-1 y CD28 se ha empleado para estimular la respuesta de las células T y para utilizar el receptor de fusión estimulador CTLA-4-CD28 y para inhibir la reactividad de las células T fuera de diana utilizando receptores inhibidores con el dominio de señalización de PD-1 y CTLA-4 (Morales-Kastresana y col., Clin Cancer Res 19(20) (2013), 5546-5548, Yin y col., J Leukoc Biol 73(1) (2003), 178-182). Además, se describieron
45 construcciones de fusión PD-1-CD28 que contienen un dominio extracelular truncado de PD-1 y el dominio transmembrana e intracelular de CD28 (Ankri y col., J. Immunol 191(8) (2013), 4121-4129). Además, se describió una proteína de fusión PD-1-CD28 que contiene un dominio extracelular truncado de PD-1 y el dominio intracelular, el dominio transmembrana más parte del dominio extracelular CD28 (Prosser y col., Mol. Immunol. 51(3-4) (2012), 263-272). Los documentos WO2013019615, US2014242049 y WO2013062365 describen cada uno proteínas de fusión
50 que comprenden como una parte extracelular PD-1 y como un resto transmembrana e intracelular CD28.

Sin embargo, en vista de la inhibición de células T mediada por PD-L1, todavía existe la necesidad de proporcionar medios mejorados que tengan el potencial de mejorar la seguridad y eficacia de ACT y superar las desventajas anteriores.

- 55 Esta necesidad se aborda mediante la presente invención proporcionando las realizaciones como se define en las reivindicaciones.

En esta invención se describe una proteína de fusión que comprende un polipéptido PD-1 y un dominio intracelular de
60 un polipéptido CD28, donde el polipéptido PD-1 comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de

PD-1.

La proteína de fusión PD-1-CD28 descrita en esta invención se caracteriza porque el polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1 está unido operativamente a través de su extremo C al extremo N de un dominio intracelular de un polipéptido CD28.

En contraste con las proteínas de fusión PD-1-CD28 descritas en Prosser y col., Mol. Immunol. 51(3- 4) (2012), 263-272 y Ankri y col., J. Immunol 191(8) (2013), 4121-4129, la proteína de fusión PD-1-CD28 de la presente invención comprende el dominio transmembrana del polipéptido PD-1. Como se muestra en los Ejemplos adjuntos, la arquitectura de las proteínas de fusión PD-1-CD28 descritas anteriormente mostró solo una modesta inducción de citocinas (2 a 3 veces) y poca o ninguna diferencia en la actividad lítica cuando se transdujeron en células T primarias. Esto está en marcado contraste con la proteína de fusión de la presente invención, que logró un aumento de hasta 300 veces en la secreción de IL-2 e IFN- γ y una fuerte proliferación de células T, así como una mejora de la actividad lítica de las células tumorales *in vitro* e *in vivo* (cf. Figuras 2, 3, 5 y 9). Por consiguiente, se descubrió sorprendentemente que la proteína de fusión PD-1-CD28 de la presente invención que porta el dominio transmembrana (PTM) de PD-1 con referencia a las proteínas de fusión PD-1-CD28 que tienen una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 14 (murino/ratón) o SEQ ID NO: 24 (humano) es superior a las construcciones de fusión PD-1-CD28 descritas anteriormente descritas en Prosser y col., Mol. Immunol. 51(3-4) (2012), 263-272 (en referencia a una proteína de fusión PD-1-CD28 con una arquitectura como la proteína de fusión denominada en esta invención "CEX") y Ankri y col., J. Immunol 191(8) (2013), 4121-4129 (en referencia a una proteína de fusión PD-1-CD28 con una arquitectura como la proteína de fusión denominada en esta invención "CTM"; cf. Figura 2). Más precisamente, se muestra en los Ejemplos adjuntos que la fusión del dominio extracelular más el dominio transmembrana al dominio intracelular de CD28 protege a las células transducidas de la inhibición de células T inducida por PD-1-L1 y convierte la señal inhibitoria en una señal de coestimulación para una función óptima de las células T. Como se muestra en la Figura 6E (como una prueba de concepto del mecanismo de acción), se descubrió sorprendentemente que la proteína de fusión del dominio extracelular y transmembrana de PD-1 con el dominio intracelular de CD28 protege las células T específicas de antígeno de la anergia mediada por PD-1-PD-L1 y convierte la señal inhibitoria en una coestimulación. En otras palabras, células, como las células T, transducidas con la proteína de fusión PD-1-CD28 de la presente invención son resistentes a la anergia mediada por PD-1-PD-L1. Además, la funcionalidad de las construcciones de fusión PD-1-CD28 basadas en las secuencias de PD-1 y CD28 humanas se muestra en la Figura 8.

Por consiguiente, en esta invención se describe una proteína de fusión que comprende un polipéptido PD-1 que está unido operativamente a través de su extremo C al extremo N de un dominio intracelular de un polipéptido CD28, donde el polipéptido comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1.

En el contexto de la presente invención, el término "proteína de fusión" se refiere a una proteína que está hecha de partes de polipéptidos de diferentes fuentes. Por consiguiente, también puede entenderse como una "proteína quimérica". Por lo general, las proteínas de fusión son proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes (o preferentemente ADNc) que originalmente codificaban proteínas separadas. La traducción de este gen de fusión (o ADNc de fusión) da como resultado un solo polipéptido, preferentemente con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o terapéutica. A continuación, se describen más detalles sobre la producción de la proteína de fusión de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial o un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, el término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende o consiste en cadenas de monómeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (amida). Los enlaces peptídicos son enlaces químicos covalentes que se forman cuando el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de otro. En esta invención, un «polipéptido» no se limita a una molécula con una longitud definida. Por lo tanto, en esta invención el término "polipéptido" se refiere a un péptido, un oligopéptido, una proteína o un polipéptido que abarca cadenas de aminoácidos, donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes. Sin embargo, en esta invención el término "polipéptido" también abarca peptidomiméticos de dichas proteínas/polipéptidos en los que los aminoácidos y/o enlaces peptídicos se han reemplazado por análogos funcionales. El término polipéptido también se refiere a, y no excluye, modificaciones del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Tales modificaciones están bien descritas en la técnica.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos pueden denominarse en esta invención por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

Como se describe en esta invención, la proteína de fusión puede comprender una parte de fragmento/polipéptido del polipéptido PD-1 de longitud completa y una parte de fragmento/polipéptido del polipéptido CD28 de longitud completa. Por tanto, el «polipéptido PD-1» que está comprendido en la proteína de fusión proporcionada en esta invención es una parte de fragmento/polipéptido del polipéptido PD-1 de longitud completa. Las secuencias de aminoácidos de PD-1 murino/de ratón y humano de longitud completa se muestran en esta invención como SEQ ID NO: 2 (murino/de ratón codificado por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 1) y 4 (humano codificado por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 3), respectivamente (el número de entrada Uni Prot de PD-1 humano de longitud completa es Q15116 (número de acceso con el número de versión de entrada 138 y la versión 3 de la secuencia); el número de entrada Uni Prot del PD-1 murino/de ratón de longitud completa es Q02242 (número de acceso con el número de versión de entrada 125 y la versión 1 de la secuencia). De manera análoga, el «polipéptido CD28» que está comprendido en la proteína de fusión proporcionada en esta invención es una parte de fragmento/polipéptido del polipéptido CD28 de longitud completa. Las secuencias de aminoácidos de CD28 de longitud completa humana y murina/de ratón se muestran en esta invención como SEQ ID NO: 26 (murina/de ratón codificada por la secuencia de ADN de copia (ADNc) mostrada en la SEQ ID NO: 25) y 28 (humana codificada por la secuencia de ADNc mostrada en la SEQ ID NO: 27), respectivamente. Como se mencionó anteriormente, la proteína de fusión proporcionada en esta invención comprende un polipéptido PD-1 que está unido operativamente a través de su extremo C al extremo N de un dominio intracelular de un polipéptido CD28, en donde el polipéptido PD-1 comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1.

La proteína de fusión proporcionada en esta invención puede comprender los aminoácidos 1 a 200, preferentemente los aminoácidos 1 a 190 de la secuencia de aminoácidos de PD-1 como se muestra en SEQ ID NO: 2 (PD-1 de longitud completa murina/de ratón como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 1). Además, la proteína de fusión PD-1-CD28 proporcionada en esta invención puede comprender los aminoácidos 1 a 180, 1 a 181, 1 a 182, 1 a 183, 1 a 184, 1 a 185, 1 a 186, 1 a 187, 1 a 188, 1 a 189, 1 a 190, 1 a 191, 1 a 192, 1 a 193, 1 a 194, 1 a 195, 1 a 196, 1 a 197, 1 a 198, 1 a 199, o 1 a 200 de la secuencia de aminoácidos de PD-1 como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en la SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, el polipéptido PD-1 que está comprendido en la proteína de fusión de la presente invención puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 8 (como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 7) (murino/ratón). Sin embargo, más preferentemente, la proteína de fusión comprende polipéptidos que se derivan de un origen humano. Por lo tanto, más preferentemente, la proteína de fusión proporcionada en esta invención comprende los aminoácidos 1 a 200, incluso más preferentemente los aminoácidos 1 a 191 de la secuencia de aminoácidos de PD-1 como se muestra en SEQ ID NO: 4 (PD-1 de longitud completa humana como se codifica por el ADNc mostrado en SEQ ID NO: 3). Por consiguiente, la proteína de fusión proporcionada en esta invención comprende preferentemente los aminoácidos 1 a 180, 1 a 181, 1 a 182, 1 a 183, 1 a 184, 1 a 186, 1 a 187, 1 a 188, 1 a 189, 1 a 190, 1 a 191, 1 a 192, 1 a 193, 1 a 194, 1 a 195, 1 a 196, 1 a 197, 1 a 198, 1 a 199, o 1 a 200 de la secuencia de aminoácidos de PD-1 como se muestra en la SEQ ID NO: 4 (PD-1 de longitud completa humana como se codifica por el ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 3). Por ejemplo, el polipéptido PD-1 que está comprendido en la proteína de fusión como se describe en esta invención puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 16 (como se codifica por el ADNc mostrado en SEQ ID NO: 15). Por consiguiente, la proteína de fusión PD-1-CD28 comprende la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 16 o una secuencia que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la SEQ ID NO: 16 y que se caracteriza por tener una actividad de unión a PD-L1 o PD-L2.

La subestación, eliminación, inserción/adición mencionada anteriormente puede ser una mutación conservadora. Una "mutación conservadora" se refiere a sustituciones de aminoácidos en una proteína con otros aminoácidos que tienen características similares (por ejemplo, carga, tamaño de cadena lateral, hidrofobicidad/hidrofiliidad, conformación de

la estructura, rigidez, etc.) de modo que los cambios se pueden hacer con frecuencia sin alterar la actividad biológica de la proteína. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª Ed.)) (1987). Además, es menos probable que las sustituciones de aminoácidos estructural o funcionalmente similares interrumpen la actividad biológica. Varias realizaciones de los compuestos de unión de la presente invención comprenden cadenas polipeptídicas con secuencias que incluyen hasta ninguna, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos específicas descritas en esta invención, por ejemplo, SEQ ID NO: 6, 8, 10, 16, 18 o 20.

10

Por consiguiente, el polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1 (PD-1 de longitud completa humana (SEQ ID NO: 4 (codificado por la secuencia de ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 3)) puede comprender una secuencia que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 16, donde la secuencia de aminoácidos tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferentemente 1 a 8, más preferentemente 1 a 6, incluso más preferentemente 1 a 5, incluso más preferentemente 1 o 2, o incluso más preferentemente 1 sustitución o sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 16. Si en la proteína de fusión proporcionada en esta invención el polipéptido PD-1 comprende una o más sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, respectivamente, entonces dicha proteína de fusión se caracteriza por tener una actividad de unión a PD-L1 y/o PD-L2. Esta actividad de unión se define como la capacidad de unirse al ligando PD-L1 y/o PD-L2 con la misma afinidad, mejorada o reducida en comparación con la proteína PD-1 natural de longitud completa (por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4). La proteína PD-1 de longitud completa natural se une al ligando PD-L1 con una constante de disociación en equilibrio (KD) de 770 nM o menos (Butte y col, Molecular Immunology 45 (2008), 3567-3572) y las proteínas PD-1 de longitud completa naturales se unen al ligando PD-L2 con una constante de disociación en equilibrio (KD) de 140 nM o menos (Butte y col, Molecular Immunology 45 (2008), 3567-3572). Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, el polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1 (como, por ejemplo, se muestra en SEQ ID NO: 16 o una variante del mismo que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 16) puede unirse al ligando PD-L1 y/o PD-L2 con la misma unión que lo hace la proteína PD-1 de longitud completa natural. De manera alternativa, en el contexto de la presente invención, el polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1 (como se muestra, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 16 o una variante del mismo que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 16) puede unirse al ligando PD-L1 y/o PD-L2 con una afinidad de unión que es al menos 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5 veces mayor (es decir, mejorada) o menor (es decir, reducida) en comparación con la proteína PD-1 natural de longitud completa. Como se emplea en esta invención, el término "KD" pretende referirse a la constante de disociación y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para las interacciones proteína-proteína entre, por ejemplo, el polipéptido PD-1 descrito anteriormente en esta invención y PD-L1 y/o PD-L2 se pueden determinar utilizando procedimientos bien establecidos en la técnica. Procedimientos para determinar la afinidad de unión hacia el ligando PD-L1 y/PD-L2 son conocidos en la técnica y se describen en esta invención más adelante con más detalle e incluyen, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (SPR), medición biacore, citometría de flujo o ELISA.

Como se describe en esta invención, la proteína de fusión PD-1-CD28 comprende el dominio extracelular de PD-1 que se encuentra en los aminoácidos 1 a 169 de la proteína PD-1 de longitud completa de ratón como se muestra en SEQ ID NO: 2 (como se codifica por el ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 1). Alternativamente, la proteína de fusión comprende el dominio extracelular de PD-1 que se encuentra en los aminoácidos 1 a 170 de la proteína PD-1 de longitud completa humana como se muestra en la SEQ ID NO: 4 (como se codifica por el ADNc que se muestra en la SEQ ID NO: 3). Como se describe en esta invención, la proteína de fusión PD-1-CD28 comprende o consiste en el dominio extracelular de PD-1 como se muestra en SEQ ID NO: 8 (como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 7) o más preferentemente como se muestra en SEQ ID NO: 18 (como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 17). El dominio extracelular de la proteína PD-1 (que está comprendido en la proteína de fusión proporcionada en esta invención) se caracteriza por la capacidad de unirse a los ligandos naturales de PD-1 (es decir, PD-L1 (humano) (Entrada Uni Prot: Q9NZQ7 (número de acceso con la versión de entrada: 130 y la versión 1 de la secuencia) o PD-L2 (humano) (Entrada Unit Prot: Q9BQ51 (número de acceso con la versión de entrada: 115 y la versión 2 de la secuencia) con la misma afinidad (es decir, igual), mejorada o reducida (es decir, disminuida) en comparación con la proteína PD-1 natural. La afinidad de una proteína de fusión por PD-L1 y/o PD-L2 se puede analizar como se describe más adelante en esta invención. Las secuencias de aminoácidos de PD-L1 de longitud completa humana y PD-L2 de longitud completa humana se muestran en esta invención como SEQ ID NO: 34 (PD-L1 codificado por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 33) o SEQ ID NO: 36 (PD-L2 codificado por la

secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 35). Se puede lograr una afinidad reducida (es decir, disminuida), igual (es decir, igual) o preferentemente mejorada por PD-L1 o PD-L2 mediante mutaciones puntuales en el dominio extracelular de la proteína de fusión proporcionada en esta invención. Por ejemplo, cambiar la alanina en la posición correspondiente a la posición de aminoácido 132 de SEQ ID NO: 18 por una leucina mejora la afinidad de PD-1 (es decir, la unión) a PD-L1 y PD-L2. Al mejorar la afinidad del polipéptido PD-1 (que está comprendido en la proteína de fusión proporcionada en esta invención) a PD-L1 y PD-L2, la actividad de la proteína de fusión proporcionada en esta invención en las células se mejora en términos de secreción, proliferación y lisis de citocinas.

La afinidad de unión de la proteína de fusión proporcionada en esta invención a PD-L1 o PD-L2 se puede evaluar mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia que incluyen, entre otros, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación, transferencia Western, microscopía confocal o convencional (Terawaki y col., *International Immunology*, 19(7) (2007), 881-890; Cheng y col., *J Biol Chem*, 288(17) (2013), 11771-11785; Ghiotto y col., *Int Immunol*, 22(8) (2010), 651-660.). En particular, la unión de dicha proteína de fusión a PD-L1 o PD-L2 conduce a la agrupación de células T alrededor de la célula diana que podría ser un tumor u otra célula inmunitaria y la activación de esas células por medio de la proteína de fusión. La propia proteína de fusión se agrupa en el punto de contacto con la célula diana. Esto se puede medir y/o visualizar, por ejemplo, mediante microscopía confocal o convencional. La unión de la proteína de fusión (es decir, del polipéptido PD-1 que está comprendido en la proteína de fusión) a PD-L1 o PD-L2 es fundamental para cualquier señalización posterior a través de los motivos de señalización CD28 de la proteína de fusión y los efectos resultantes de la misma. Las mutaciones en la proteína de fusión que dan como resultado una mayor afinidad por los ligandos PD-L1 y/o PD-L2 pueden mejorar la funcionalidad de la proteína de fusión. Los procedimientos para medir la afinidad de una proteína por otra son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen resonancia de plasmón superficial (SPR), medición de biacore, citometría de flujo o ELISA.

Como se describió anteriormente, la proteína de fusión PD-1-CD28 proporcionada en esta invención comprende el dominio transmembrana de PD-1 que se encuentra en los aminoácidos 170 a 191 de la proteína PD-1 de longitud completa de ratón como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (codificada por el ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 1). El dominio transmembrana de PD-1 se encuentra en los aminoácidos 171 a 191 de la proteína PD-1 de longitud completa humana (como se muestra en la SEQ ID NO: 4 (como lo codifica el ADNc que se muestra en la SEQ ID NO: 3)). El dominio transmembrana de PD-1 es un componente importante de la proteína de fusión de la presente invención y permite la transducción de señales a los dominios intracelulares de CD28 tras el acoplamiento del receptor PD-1 (es decir, el polipéptido PD-1 de la proteína de fusión). En el contexto de la presente invención, el dominio transmembrana que está comprendido en las proteínas de fusión PD-1-CD28 puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 (murino/ratón como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 9) o SEQ ID NO: 20 (humano como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 19). Sin embargo, el dominio transmembrana que está comprendido en la proteína de fusión como se describe en esta invención (SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 20) puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que incluye hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferentemente, 1 a 8, más preferentemente 1 a 6, incluso más preferentemente 1 a 4, incluso más preferentemente 1 a 2, o incluso más preferentemente 1 sustitución o sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10 (murino/ratón) o 20 (humano). Si en la proteína de fusión proporcionada en esta invención el dominio transmembrana no comprende ninguna, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10 (murino/ratón) o 20 (humano), entonces dicha proteína de fusión se caracteriza por mostrar la misma o preferentemente una actividad de transducción de señales mejorada. La actividad de transducción de señales se puede medir mediante citometría de flujo, transferencia Western o ensayos basados en ELISA que detectan proteínas fosforiladas tales como el homólogo 1 del oncogén del timoma murino V-akt (AKT). La actividad de transducción de señales también se puede detectar mediante efectos funcionales posteriores tales como liberación de citocinas, proliferación o actividad lítica de células, tales como células T (tal como se describe, por ejemplo, en esta invención en los ejemplos adjuntos y en Krutzik y col, *Methods Mol Biol*, 699 (2011), 179-202; Ekkens y col, *Infect Immun*, 75(5) (2007), 2291-2296; Ge y col, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(5) (2002), 2983-2988; Duwell y col, *Cell Death Differ*, 21(12) (2014), 1825-1837, Erratum in: *Cell Death Differ*, 21(12) (2014), 161). Por consiguiente, el dominio transmembrana de PD-1 es un componente importante de la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención y proporciona transducción de señal a los dominios intracelulares de CD28 tras el acoplamiento del dominio receptor de PD-1 (es decir, el polipéptido PD-1 de la proteína de fusión) que se puede medir mediante, por ejemplo, la producción de citocinas, la proliferación o la actividad lítica de células tales como células T. Por consiguiente, la transmembrana de PD-1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20 (codificada por el ADNc mostrado en SEQ ID NO: 19).

El dominio intracelular de la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención se deriva del gen CD28 (humano) (Número de entrada Uni Prot: P10747 (número de acceso con la versión de entrada: 164 y versión 1 de la secuencia) y proporciona actividad de CD28, definida como producción de citocinas, proliferación y actividad lítica de

la célula transducida descrita en esta invención, como una célula T transducida. La actividad de CD28 se puede medir mediante liberación de citocinas mediante ELISA o citometría de flujo de citocinas tales como interferón-gamma (IFN-γ) o interleucina 2 (IL-2) (como se describe en esta invención a continuación en los Ejemplos adjuntos), proliferación de células T medida, por ejemplo, mediante medición de ki67-, cuantificación celular mediante citometría de flujo (como se describe a continuación en los Ejemplos adjuntos), o actividad lítica como se evalúa mediante medición de impedancia en tiempo real de la célula diana (usando, por ejemplo, un instrumento ICELLigence como se describe a continuación en los Ejemplos adjuntos en la sección 3.1 y, por ejemplo, en Thakur y col., Biosens Bioelectron. 35(1) (2012), 503-506; Krutzik y col., Methods Mol Biol. 699 (2011), 179-202; Ekkens y col., Infect Immun. 75(5) (2007), 2291-2296; Ge y col. Proc Natl Acad Sci USA. 99(5) (2002), 2983-2988; Duwell y col., Cell Death Differ. 21(12) (2014), 1825-1837, Erratum in: Cell Death Differ. 21(12) (2014), 161). Los dominios de señalización PYAP (AA 208 a 211 de SEQ ID NO: 28 (codificados por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 27)) y YNMN (AA 191 a 194 de SEQ ID NO: 28) son beneficiosos para la función del polipéptido CD28 y los efectos funcionales enumerados anteriormente. La secuencia de aminoácidos del dominio YNMN se muestra en la SEQ ID NO: 29; la secuencia de aminoácidos del dominio PYAP se muestra en la SEQ ID NO: 30. Por consiguiente, en la proteína de fusión de la presente invención, el polipéptido CD28 comprende preferentemente una secuencia derivada del dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30). En el contexto de la presente invención, un dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30) se caracteriza por una actividad CD28, definida como producción de citocinas, proliferación y actividad lítica de una célula transducida descrita en esta invención, como, por ejemplo, una célula T transducida. Por consiguiente, el dominio intracelular de la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (humana) (como se codifica por la secuencia de ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 21) o SEQ ID NO: 12 (de ratón/murina) (como se codifica por la secuencia de ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 11). Sin embargo, en la proteína de fusión como se describe en esta invención, uno o ambos de estos dominios pueden mutarse a FMNM (SEQ ID NO: 31) y/o AYAA (SEQ ID NO: 32), respectivamente. Cualquiera de estas mutaciones reduce la capacidad de la proteína de fusión para liberar citocinas sin afectar su capacidad para proliferar y puede usarse ventajosamente para prolongar la viabilidad y, por lo tanto, el potencial terapéutico de las células transducidas. O, en otras palabras, dicha mutación no funcional mejora preferentemente la persistencia de las células que se transducen con la proteína de fusión proporcionada en esta invención *in vivo*. Sin embargo, estos motivos de señalización pueden estar presentes en cualquier sitio dentro del dominio intracelular de la proteína de fusión proporcionada en esta invención.

Por consiguiente, como se describe en esta invención, la proteína de fusión PD-1-CD28 puede comprender los aminoácidos 170 a 218, preferentemente los aminoácidos 178 a 218 de la secuencia de aminoácidos de CD28 como se muestra en SEQ ID NO: 26 (CD28 de longitud completa de ratón como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 25). Como se describe en esta invención, el polipéptido CD28 intracelular puede ser de cualquier longitud siempre que el dominio intracelular de la proteína de fusión como se describe en esta invención comprenda las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30). Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, el dominio intracelular de la CD28 de la proteína de fusión PD-1-CD28 puede comprender una secuencia derivada del dominio intracelular del polipéptido CD28 que tiene las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30). Por ejemplo, el polipéptido CD28 que está comprendido en la proteína de fusión como se describe en esta invención puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12 (como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 11). Como se mencionó, la proteína de fusión comprende preferentemente polipéptidos de origen humano. Por lo tanto, más preferentemente, la proteína de fusión proporcionada en esta invención comprende los aminoácidos 170-220, incluso más preferentemente los aminoácidos 180 a 220 de la secuencia de aminoácidos de CD28 como se muestra en la SEQ ID NO: 28 (CD28 de longitud completa humana como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en la SEQ ID NO: 27). Por ejemplo, el polipéptido CD28 que está comprendido en la proteína de fusión puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22 (como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en la SEQ ID NO: 21). Como se describe en esta invención, el polipéptido CD28 intracelular puede ser de cualquier longitud siempre que el dominio intracelular de la proteína de fusión comprenda las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30). Por consiguiente, también se describe en esta invención que el dominio intracelular del CD28 de la proteína de fusión PD-1-CD28 puede comprender una secuencia derivada del dominio intracelular del polipéptido CD28 que tiene las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30). Por ejemplo, el polipéptido CD28 que está comprendido en la proteína de fusión puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 12 (murino/ratón) o 22 (humano). En el contexto de la presente, el polipéptido CD28 de la proteína de fusión PD-1-CD28 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. En el contexto de la presente, la proteína de fusión comprende un dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30). Por consiguiente, en el contexto de la presente, el polipéptido CD28 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (humano).

Además, la proteína de fusión PD-1-CD28 proporcionada en esta invención puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 14 (proteína de fusión de PTM murina/de ratón (mPTM) como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en la SEQ ID NO: 13). Más preferentemente, la proteína de fusión proporcionada en esta invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 24 (proteína de fusión de PTM humana (hPTM) como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en la SEQ ID NO: 23). Por consiguiente, en esta invención se describe una proteína de fusión PD-1-CD28 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

Además, en esta invención se describe una fusión de proteína que consiste en SEQ ID NO: 24, en donde dicha proteína de fusión tiene

- (a) un polipéptido PD-1 que comprende una secuencia que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferentemente 1 a 8, más preferentemente 1 a 6, incluso más preferentemente 1 a 5, incluso más preferentemente 1 o 2, o incluso más preferentemente 1 sustitución o sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 18 y que se caracteriza por tener una actividad de unión a PD-L1 o PD-L2;
- (b) un dominio transmembrana de PD-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y
- (c) un polipéptido CD28 que comprende una secuencia derivada del dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias YMNM (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30).

Como se describió anteriormente, la actividad de unión a PD-L1 y/o PD-L2 se define como la capacidad de unirse al ligando de PD-L1 y/o PD-L2 con la misma afinidad, mejorada o reducida en comparación con la proteína PD-1 de longitud completa natural (por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 4 (como se codifica por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 3). Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, el polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular de PD-1 puede unirse al ligando PD-L1 y/o PD-L2 con la misma unión que la proteína PD-1 de longitud completa natural. Alternativamente, en el contexto de la presente invención, el polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular puede unirse al ligando PD-L1 y/o PD-L2 con una afinidad de unión que es al menos 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5 veces mayor (es decir, mejorada) o menor (es decir, reducida) en comparación con la proteína PD-1 de longitud completa natural. Además, los procedimientos para la determinación de la actividad de unión a PD-L1 y/o PD-L2 son bien conocidos por el experto en la materia y se describen anteriormente en esta invención.

En el contexto de la presente invención, el término "PD-1" se refiere a la proteína de muerte celular programada 1, también conocida como PD-1 y CD279 (grupo de diferenciación 279). PD-1 es una proteína que en humanos está codificada por el gen PDCD1. Además, PD-1 es un receptor de superficie celular que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa en células T y pro-B. Se sabe que PD-1 se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-1 y sus ligandos desempeñan un papel importante en la regulación negativa del sistema inmunitario al impedir la activación de las células T, lo que a su vez reduce la autoinmunidad y promueve la autotolerancia. El efecto inhibitorio de PD-1 se logra a través de un mecanismo dual de promoción de la apoptosis (muerte celular programada) en células T específicos de antígeno en ganglios linfáticos, al tiempo que se reduce la apoptosis en células T reguladores (células T supresores). Las secuencias de proteínas del PD-1 humano y de ratón se muestran en esta invención en SEQ ID NO: 4 (como se codifica por la secuencia de ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 3) o SEQ ID NO: 2 (como se codifica por la secuencia de ADNc que se muestra en SEQ ID NO: 1). Las secuencias de ácido nucleico de PD-1 humano y de ratón se muestran en las SEQ ID NO: 3 (humano) y 1 (murino/ratón), respectivamente.

En el contexto de la presente invención, el término "CD28" se refiere al receptor "grupo de diferenciación 28". CD28 es una de las proteínas expresadas en las células T que proporcionan señales coestimuladoras necesarias para la activación y supervivencia de las células T. La estimulación de células T a través de CD28 además del receptor de células T (TCR) puede proporcionar una señal potente para la producción de diversas interleucinas (por ejemplo, IL-6). CD28 es el receptor de las proteínas CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Las secuencias de aminoácidos de la proteína CD28 humana y de ratón se muestran en esta invención como SEQ ID NO: 28 (codificada por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 27) o SEQ ID NO: 26 (codificada por la secuencia de ADNc mostrada en SEQ ID NO: 25). Las secuencias de ácido nucleico de CD28 humano y de ratón se muestran en las SEQ ID NO: 27 (humano) y 25 (murino/ratón), respectivamente.

En el contexto de la presente invención, el término "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre al menos dos secuencias de proteínas, es decir, entre el polipéptido PD-1 descrito en esta invención que comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1 y el dominio intracelular de CD28. En el contexto de la presente

invención, el polipéptido PD-1 y el polipéptido CD28 como están comprendidos en las proteínas de fusión de la presente invención pueden estar unidos covalentemente. La unión covalente de un polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1 con un dominio intracelular de un polipéptido CD28 da como resultado una proteína de fusión en la que dicho polipéptido PD-1 está conectado a través de su extremo C al extremo N del polipéptido CD28. Un enlace covalente es un enlace químico que se caracteriza por el intercambio de pares de electrones entre átomos, como, entre otros, se obtiene mediante la unión cruzada ejemplificada en esta invención a través de compuestos químicos. Sin embargo, también se prevé la producción recombinante de construcciones como se describe en esta invención, es decir, el polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular y el dominio transmembrana de PD-1 y un dominio intracelular unido covalentemente de un polipéptido CD28. En el contexto de la presente invención, "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre al menos dos polipéptidos, lo que significa que ambos polipéptidos conservan sus funcionalidades.

Además, la proteína de fusión proporcionada en esta invención puede comprender un enlazador (o "espaciador"). Un enlazador es generalmente un péptido que tiene una longitud de hasta 20 aminoácidos. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, el enlazador puede tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. Por ejemplo, la proteína de fusión proporcionada en esta invención puede comprender un enlazador entre el polipéptido PD-1 y el polipéptido CD28. Dichos enlazadores tienen la ventaja de que pueden hacer que sea más probable que los diferentes polipéptidos de la proteína de fusión (es decir, el polipéptido PD-1 y el polipéptido CD28) se plieguen independientemente y se comporten como se espera. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el polipéptido PD-1 y el polipéptido CD28 pueden estar comprendidos en un polipéptido multifuncional de cadena simple. Una construcción de fusión PD-1-CD28 monocatenaria, por ejemplo, puede consistir en (a) polipéptido(s) que comprende (a) dominio(s) derivado (s) de PD-1 y (a) dominio intracelular de un polipéptido CD28. Dichos dominios están conectados por un enlazador polipeptídico, donde dicho enlazador está dispuesto entre dicho(s) dominio(s) derivado(s) de PD-1 y dicho dominio polipeptídico de CD28 intracelular.

En el contexto de la presente invención, el término "extremo N" puede usarse indistintamente con el extremo amino de un polipéptido, el extremo NH₂, el extremo N o el extremo amino. El término significa el inicio natural de una proteína o polipéptido.

En el contexto de la presente invención, el término "extremo C" puede usarse indistintamente con el extremo carboxilo de un polipéptido, el extremo carboxilo, el extremo carboxilo, la cola del extremo C, el extremo C o el extremo COOH. El término significa el extremo natural de una proteína o polipéptido.

En esta invención, el término "dominio extracelular", en particular en el contexto del dominio extracelular de PD-1, se refiere a la parte del receptor (es decir, de PD-1) que sobresale de la membrana en el exterior de la célula. La actividad del dominio extracelular es unirse a un ligando específico (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2). En el contexto de la presente invención, el dominio extracelular de la proteína de fusión PD-1-CD28 tiene la secuencia de aminoácidos/polipéptido de SEQ ID NO: 18 o una secuencia de polipéptidos que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con SEQ ID NO: 18 y que se caracteriza por tener actividad de unión a PD-L1 y/o PD-L2 como se describió anteriormente en esta invención. En esta invención, el término "dominio transmembrana", en particular en el contexto del dominio transmembrana de PD-1, se refiere a la parte del receptor (es decir, PD-1) que se encuentra naturalmente dentro de la membrana de la célula (por ejemplo, la célula T). En el contexto de la presente invención, el dominio transmembrana de PD-1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la SEQ ID NO: 20 y que se caracteriza por mostrar la misma o preferentemente una actividad de transducción de señales mejorada como se describió anteriormente en esta invención. En esta invención, el término "dominio intracelular", en particular en el contexto del dominio intracelular de CD28, se refiere al dominio citoplasmático del receptor (es decir, CD28). En el contexto de la presente invención, el dominio intracelular se refiere a una secuencia de aminoácidos que se deriva del dominio intracelular de un polipéptido CD28 que tiene las secuencias YNMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30), como la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22. El dominio intracelular interactúa con el interior de la célula.

En la técnica se conoce comúnmente la producción de las proteínas de fusión como se describe en esta invención. Por ejemplo, la proteína de fusión como se describe en esta invención puede crearse mediante ingeniería genética de un gen de fusión. Esto generalmente implica eliminar el codón de terminación de una secuencia de ADNc que codifica el primer polipéptido (es decir, el polipéptido PD-1), a continuación agregar la secuencia de ADNc del segundo polipéptido (es decir, el polipéptido CD28) en el marco a través de la PCR de extensión de ligación o superposición. Esa secuencia de ADN puede expresarse a continuación por una célula como una única proteína. Por ejemplo, la proteína de fusión de la presente invención se puede generar mediante PCR superpuesta y clonación de expresión recombinante en un vector retroviral (por ejemplo, el vector pMP71) como se describe en los ejemplos ilustrativos

adjuntos.

También se describen una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión descritas en esta invención.

5

El término "molécula de ácido nucleico" se refiere a la secuencia de bases que comprende bases de purina y pirimidina que están comprendidas por polinucleótidos, por lo que dichas bases representan la estructura primaria de una molécula de ácido nucleico. En esta invención, el término "molécula de ácido nucleico" incluye ADN, ADNc, ADN genómico, ARN, formas sintéticas de ADN y polímeros mixtos que comprenden dos o más de estas moléculas.

10 Además, el término "molécula de ácido nucleico" incluye ambas cadenas, sentido y antisentido. Además, la "molécula de ácido nucleico" descrita en esta invención puede contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína de fusión humana y de ratón de la presente invención se muestran en la SEQ ID NO: 23 (humana) o la SEQ ID NO: 13 (de ratón).

15

Las moléculas de ácido nucleico como se describen en esta invención pueden estar bajo el control de secuencias reguladoras. Por ejemplo, se pueden emplear promotores, potenciadores transcripcionales y/o secuencias que permiten la expresión inducida de la proteína de fusión de la invención. En el contexto de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico se expresan bajo el control de un promotor constitutivo o inducible. Promotores adecuados son, por ejemplo, el promotor CMV (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor UBC (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), PGK (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor EF1A (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor CAGG (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor SV40 (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor COPIA (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor ACT5C (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor TRE (Qin y col, PLoS One 5(5) (2010), el0611), el promotor Oct3/4 (Chang y col, Molecular Therapy 9 (2004), S367-S367 (doi: 10.1016/j.ymthe.2004.06.904)), o el promotor Nanog (Wu y col, Cell Res. 15(5) (2005), 317-24).

20

El término "secuencia reguladora" se refiere a secuencias de ADN, que son necesarias para efectuar la expresión de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, las secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión ribosómico y terminadores. En eucariotas, generalmente las secuencias de control incluyen promotores, terminadores y, en algunos aspectos, potenciadores, transactivadores o factores de transcripción. El término "secuencia de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes ventajosos adicionales.

30

Además, en esta invención se describe que las moléculas de ácido nucleico pueden contener, por ejemplo, enlaces tioéster y/o análogos de nucleótidos. Dichas modificaciones pueden ser útiles para la estabilización de la molécula de ácido nucleico contra endo y/o exonucleasas en la célula. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden transcribirse mediante un vector apropiado que contiene un gen quimérico que permite la transcripción de dicha molécula de ácido nucleico en la célula. A este respecto, también debe entenderse que dicho polinucleótido puede usarse para estrategias de "direccionamiento génico" o "terapia génica". En otra realización, dichas moléculas de ácido nucleico están marcadas. Los procedimientos para la detección de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, transferencia Southern y Northern, PCR o extensión de cebadores. Esta realización puede ser útil para seleccionar procedimientos para verificar la introducción exitosa de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente durante estrategias de terapia génica. Dicha (s) molécula(s) de ácido nucleico puede (n) ser una molécula de ácido nucleico quimérica producida de forma recombinante que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, ya sea sola o en combinación. En el contexto de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es parte de un vector.

40

En el presente documento también se describen vectores que comprenden la molécula de ácido nucleico descrita en esta invención. En esta invención, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico circular o lineal que puede replicarse de forma autónoma en una célula huésped (es decir, en una célula transducida) en la que se ha introducido. El "vector", como se usa en esta invención, se refiere particularmente a un plásmido, un cósmido, un virus, un bacteriófago y otros vectores comúnmente utilizados en ingeniería genética. En una realización preferida, el vector tal como se describe en esta invención es adecuado para la transformación de células, preferentemente de células T. Por consiguiente, como se describe adicionalmente en esta invención, el vector como se proporciona en esta invención es un vector de expresión. Los vectores de expresión se han descrito ampliamente en la bibliografía. En particular, el vector proporcionado en esta invención comprende preferentemente un polinucleótido recombinante (es decir, una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención), así como secuencias de control de la expresión unidas operativamente a la secuencia de nucleótidos a expresar. El vector tal como se proporciona en

50

55

60

esta invención preferentemente comprende además un promotor. El vector descrito en esta invención también puede comprender un gen marcador de selección y un origen de replicación que garantiza la replicación en el huésped (es decir, la célula transducida). Además, el vector proporcionado en esta invención también puede comprender una señal de terminación para la transcripción. Entre el promotor y la señal de terminación hay preferentemente al menos un

5 sitio de restricción o un polienlazador que permite la inserción de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica la fusión como se describe en esta invención) que se desea expresar. El experto en la técnica sabe cómo se puede poner en práctica dicha inserción. En la técnica se conocen ejemplos de vectores adecuados para comprender una molécula de ácido nucleico como se describe en esta invención para formar el vector de la presente invención. Por ejemplo, como se describe en esta invención, los vectores adecuados incluyen

10 cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan la molécula de ácido nucleico como se describe en esta invención (es decir, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención). Preferentemente, el vector tal como se describe en esta invención es un vector viral. Más preferentemente, el vector es un vector lentiviral, e incluso más preferentemente, el vector es un vector retroviral (por ejemplo, el vector pMP71). Por

15 consiguiente, el vector es un vector lentiviral o un vector retroviral. El vector permite la expresión constitutiva o condicional de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención. En este contexto, se conocen en la técnica vectores retrovirales adecuados para la expresión de la proteína de fusión tales como SAMEN CMV/SRa (Clay y col., J. Immunol. 163 (1999), 507-513), LZRS-id3-IHRES (Heemskerk y col., J. Exp. Med. 186 (1997), 1597-1602), FeLV (Neil y col., Nature 308 (1984), 814-820), SAXO (Kantoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 6563-6567), pDOL (Desiderio, J. Exp. Med. 167 (1988), 372-388), N2 (Kasid y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 473-477), LNL6 (Tiberghien y col., Blood 84 (1994), 1333-1341), pZipNEO (Chen y col., J. Immunol. 153 (1994), 3630-3638), LASN (Mullen y col., Hum. Gene Ther. 7 (1996), 1123-1129), pGIXsNa (Taylor y col., J. Exp. Med. 184 (1996), 2031-2036), LCNX (Sun y col., Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo y col., Blood 90 (1997), 952-957), HMB-Hb-Hu (Vieillard y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 11595-11600), pMV7 (Cochlovius y col., Cancer Immunol. Immunother. 46 (1998), 61-66), pSTITCH (Weitjens y col., Gene Ther. 5 (1998), 1195-1203), pLZR (Yang y col. Hum. Gene Ther. 10 (1999), 123-132), pBAG (Wu y col. Hum. Gene Ther. 10 (1999), 977-982), rKat.43.267bn (Gilham y col., J. Immunother. 25 (2002), 139-151), pLGSN (Engels y col. Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pMP71 (Engels y col. Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pGCSAM (Morgan y col. J. Immunol. 171 (2003), 3287-3295), pMSGV (Zhao y col. J. Immunol. 174 (2005), 4415-4423) o pMX (de Witte y col. J. Immunol. 181 (2008), 5128-5136). Además, los vectores lentivirales adecuados para la expresión de la proteína de fusión como se describe en esta invención son, por ejemplo, vector lentiviral PL-SIN (Hotta y col., Nat Methods. 6(5) (2009), 370-376), p156RRL-sinPPT-CMV-GFP-PRE/NheI (Campeau y col., PLoS One 4(8) (2009), e6529), pCMVR8.74 (Addgene Catalogue No.:22036), FUGW (Lois y col., Science 295(5556) (2002), 868-872), pLVX-EFI (Addgene Catalogue No.: 64368), pLVE (Brunker y col., Proc Natl Acad Sci U S A 111(9) (2014), E798-806), pCDHI-MCSI-EFI (Hu y col., Mol Cancer Res. 7(11) (2009), 1756-1770), pSLIK (Wang y col., Nat Cell Biol. 16(4) (2014), 345-356), pLJMI (Solomon y col., Nat Genet. 45(12) (2013), 1428-30), pLX302 (Kang y col., Sci Signal. 6(287) (2013), rsl3), pHR-IG (Xie y col., J Cereb Blood Flow Metab. 33(12) (2013), 1875-85), pRRLSIN (Addgene Catalogue No.: 62053), pLS (Miyoshi y col., J Virol. 72(10) (1998), 8150-8157), pLL3.7 (Lazebnik y col., J Biol Chem. 283(7) (2008), 11078-82), FRIG (Raissi y col., Mol Cell Neurosci. 57 (2013), 23-32), pWPT (Ritz-Laser y col., Diabetologia. 46(6) (2003), 810-821), pBOB (Marr y col., J Mol Neurosci. 22(1-2) (2004), 5-11), o pLEX (n.º de catálogo Addgene: 27976).

También se describen en esta invención células transducidas que expresan una proteína de fusión codificada por una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión como se describe en esta invención. Por consiguiente,

45 la célula transducida puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión como se describe en esta invención o un vector como se describe en esta invención que expresa una proteína de fusión como se describe en esta invención.

En el contexto de la presente invención, el término "célula transducida" se refiere a una célula genéticamente modificada (es decir, una célula en la que se ha introducido deliberadamente una molécula de ácido nucleico). La

50 célula transducida proporcionada en esta invención puede comprender el vector como se describe en esta invención. Preferentemente, la célula transducida proporcionada en esta invención comprende la molécula de ácido nucleico (que codifica la proteína de fusión) y/o el vector descrito en esta invención. La célula transducida como se describe en esta invención puede ser una célula que expresa de forma transitoria o estable el ADN extraño (es decir, la molécula de

55 ácido nucleico que se ha introducido en la célula). En particular, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión como se describe en esta invención puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula mediante el uso de una transducción retroviral o lentiviral. Mediante el uso de transfección de ARNm, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención puede expresarse transitoriamente. Preferentemente, la célula transducida proporcionada en esta invención se ha modificado genéticamente mediante la

60 introducción de una molécula de ácido nucleico en la célula a través de un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral

o un vector lentiviral). La expresión puede ser constitutiva o constitucional, dependiendo del sistema utilizado. La proteína de fusión PD-1- CD28 se expresa en la superficie de la célula transducida proporcionada en esta invención. La proporción extracelular del polipéptido PD-1 de la proteína de fusión puede detectarse en la superficie celular, mientras que las intracelulares (tanto transmembrana como, por ejemplo, una parte del dominio intracelular del polipéptido PD-1) se unen a la membrana pero no son detectables en la superficie celular. La detección del dominio extracelular del polipéptido PD-1 se puede llevar a cabo mediante el uso de un anticuerpo que se une específicamente a este dominio extracelular del polipéptido PD-1. Los ejemplos de dichos anticuerpos son bien conocidos en la técnica e incluyen el clon EH12.2H7 (disponible comercialmente en BioLegend, n.º de catálogo: 329911), el clon J116 (disponible comercialmente en eBioscience, n.º de catálogo: 16-9989-80), J105 (disponible comercialmente en eBioscience, n.º de catálogo: 8012-2799) o MiH4 (disponible comercialmente en eBioscience, n.º de catálogo: 14-9969). El dominio extracelular se puede detectar utilizando estos anticuerpos mediante citometría de flujo o microscopía. La célula transducida de la presente invención puede ser, por ejemplo, una célula T CD4+, una célula T CD8+, una célula T $\gamma\delta$, una célula T citolítica natural (NK), una célula citolítica natural (NK), una célula de células infiltrantes de tumores (TIL), una célula mieloide o una célula madre mesenquimal. Preferentemente, la célula transducida proporcionada en esta invención es una célula T (por ejemplo, una célula T autóloga), más preferentemente, la célula transducida es una célula T CD8+. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, la célula transducida es una célula T CD8+. Además, en el contexto de la presente invención, la célula transducida es una célula T autóloga. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, la célula transducida es preferentemente una célula T CD8+ autóloga. Además del uso de células autólogas (por ejemplo, células T) aisladas del sujeto, la presente invención también comprende el uso de células alogénicas. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, la célula transducida también puede ser una célula alogénica, tal como una célula T CD8+ alogénica. Alternativa o adicionalmente, la invención proporciona una célula T CD4+ transducida, que puede ser una célula T CD4+ autóloga o una célula T CD4+ alogénica. De manera alternativa o adicional, la invención proporciona poblaciones de células T CD4+ y/o células T CD8+ transducidas (que incluyen, de modo no taxativo, poblaciones que comprenden células T CD4+ transducidas, poblaciones que comprenden células T CD8+ transducidas y poblaciones que comprenden células T CD4+ transducidas y células T CD8+ transducidas), en donde las células transducidas pueden ser autólogas y/o alogénicas (por ejemplo, la población puede comprender solo células autólogas, solo células alogénicas o combinaciones de células autólogas y alogénicas). Las poblaciones de células T de la invención como se describe en esta invención pueden comprender células T transducidas y no transducidas.

El uso de células alogénicas se basa en el hecho de que las células, preferentemente las células T, pueden reconocer un epítipo de antígeno específico presentado por células presentadoras de antígeno (APC) extrañas, siempre que las APC expresen la molécula de MHC, clase I o clase II, a la que se restringe la población de células respondedoras específicas, es decir, la población de células T, junto con el epítipo de antígeno reconocido por las células T. Por lo tanto, el término alogénico se refiere a células que provienen de un individuo/sujeto donante no relacionado que es antígeno leucocitario humano (HLA) compatible con el individuo/sujeto que se tratará mediante, por ejemplo, la proteína de fusión PD-1-CD28 descrita en esta invención que expresa células transducidas. Las células autólogas se refieren a células que se aíslan/obtienen como se describe anteriormente en esta invención a partir del sujeto que se va a tratar con la célula transducida descrita en esta invención.

Como se describió anteriormente, la célula transducida de la presente invención se transduce con una molécula de ácido nucleico que expresa la proteína de fusión proporcionada en esta invención. En el caso de células que portan especificidad antitumoral natural, tales como células linfocitarias infiltrantes de tumores (TIL, Dudley y col, J Clin Oncol. 31(17) (2013), 2152-2159 (doi: 10.1200/JCO.2012.46.6441)) o células específicas de antígeno clasificadas de la sangre periférica de pacientes por su especificidad tumoral por citometría de flujo (Hunsucker y col., Cancer Immunol Res. 3(3) (2015), 228-235 (doi: 10.1158/2326-6066.CIR- 14-0001)), las células descritas en esta invención solo se transducirían con la proteína de fusión descrita en esta invención. Sin embargo, la célula transducida de la invención puede co-transducirse con moléculas de ácido nucleico adicionales, por ejemplo, con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de células T o un receptor de antígeno quimérico.

De acuerdo con esta invención, el término "receptor de células T" se conoce comúnmente en la técnica. En particular, en esta invención el término "receptor de células T" se refiere a cualquier receptor de células T, siempre que se cumplan los siguientes tres criterios: (i) especificidad tumoral, (ii) reconocimiento de (la mayoría) de las células tumorales, lo que significa que un antígeno o diana debe expresarse en (la mayoría) de las células tumorales y (iii) que el TCR coincida con el tipo de HLA del sujeto a tratar. En este contexto, se conocen en la técnica receptores de células T adecuados que cumplen los tres criterios mencionados anteriormente, tales como receptores que reconocen WT1 (antígeno 1 específico de tumor de Wilms; para información(es) de secuencia véase, por ejemplo, Sugiyama, Japanese Journal of Clinical Oncology 40 (2010), 377-87), MAGE (para secuencia véase, por ejemplo, W0-A1 2007/032255 y PCT/US2011/57272), SSX(solicitud provisional estadounidense n.º 61/388,983), NY-ESO-1 (para información(es) de secuencia véase, por ejemplo, PCT/GB2005/001924) y/o HER2neu (para información(es) de

secuencia véase WO-A1 2011/0280894).

El término "receptor de antígeno quimérico" o "receptor quimérico" se conoce en la técnica y se refiere a un receptor constituido por una porción extracelular de un dominio de anticuerpo de cadena simple fusionado por una secuencia espaciadora a los dominios de señal de CD3z y CD28. De nuevo, este receptor de antígeno quimérico debe proporcionar especificación tumoral y permitir el reconocimiento de la mayoría de las células tumorales. Los receptores quiméricos adecuados incluyen: anti-EGFRv3-CAR (para la secuencia, véase WO-A1 2012/138475), anti-CD22-CAR (véase WO-A1 2013/059593), anti-BCMA-CAR (véase WO-A1 2013/154760), anti-CD19-CAR (véase WO-A1 2012/079000 o US-AI 2014/0271635), anti-CD 123-CAR (véase US-AI 2014/0271582), anti-CD30-CAR (véase WO-A1 2015/028444) o anti-Mesotelina-CAR (véase WO-A1 2013/142034).

En el presente documento también se describe un procedimiento para la producción de una célula transducida que expresa una proteína de fusión como se describe en esta invención, que comprende las etapas de transducir una célula con un vector como se describe en esta invención, cultivar la célula transducida en condiciones que permitan la expresión de la proteína de fusión en o sobre dicha célula transducida y recuperar dicha célula transducida.

En el contexto de la presente invención, la célula transducida para el uso de la presente invención se produce preferentemente mediante el siguiente proceso: las células (por ejemplo, células T) se aíslan/obtienen de un sujeto (preferentemente un paciente humano). Los procedimientos para aislar/obtener células (por ejemplo, células T) de pacientes o de donantes son bien conocidos en la técnica y en el contexto de la presente las células (por ejemplo, células T) de pacientes o de donantes pueden aislarse mediante extracción de sangre o extracción de médula ósea. Después de aislar/obtener células como una muestra del paciente, las células (por ejemplo, células T) se separan de los otros ingredientes de la muestra. Se conocen varios procedimientos para separar células (por ejemplo, células T) de la muestra e incluyen, de modo no taxativo, por ejemplo, leucaféresis para obtener células de la muestra de sangre periférica de un paciente o de un donante, aislar/obtener células mediante el uso de un aparato FACSORT, recoger células vivas de células muertas de muestras de biopsia frescas que albergan células vivas a mano o mediante el uso de un micromanipulador (véase, por ejemplo, Dudley, Immunother. 26 (2003), 332-342; Robbins, Clin. Oncol. 29 (2011), 917-924 o Leisegang, J. Mol. Med. 86 (2008), 573-58). Los procedimientos y procesos descritos en este párrafo y descritos de otro modo en esta invención se realizan preferentemente con respecto a células T CD8+, pero también son aplicables a otros tipos de células T, tales como células T CD4+.

En este documento, el término "biopsia de paciente reciente" se refiere a tejido (preferiblemente tejido tumoral) extraído de un sujeto mediante cirugía o cualquier otro medio conocido, así como líneas celulares tumorales o células (aisladas) de un tejido tumoral/célula tumoral. Las células T aislados/obtenidos (por ejemplo, células T CD8+) se cultivan y expanden posteriormente, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo anti-CD3, mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 y/o mediante el uso de un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 e interleucina-2 (IL-2) (véase, por ejemplo, Dudley, Immunother. 26 (2003), 332-342 o Dudley, Clin. Oncol. 26 (2008), 5233-5239).

En una etapa posterior, las células (por ejemplo, células T) se modifican/transducen artificialmente/genéticamente mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Lemoine, J Gene Med 6 (2004), 374-386). En la técnica se conocen procedimientos para transducir células (por ejemplo, células T) e incluyen, de modo no taxativo, en un caso en el que se transduce un ácido nucleico o un ácido nucleico recombinante, por ejemplo, un procedimiento de electroporación, un procedimiento de fosfato de calcio, un procedimiento de lípidos catiónicos o un procedimiento de liposomas. El ácido nucleico que se va a transducir se puede transducir de manera convencional y altamente eficiente mediante el uso de un reactivo de transfección disponible en el mercado, por ejemplo, Lipofectamine (fabricado por Invitrogen, n.º de catálogo: 11668027). En el caso de que se use un vector, el vector puede transducirse de la misma manera que el ácido nucleico mencionado anteriormente, siempre que el vector sea un vector plasmídico (es decir, un vector que no sea un vector viral). En el contexto de la presente invención, los procedimientos para transducir células (por ejemplo, células T) incluyen la transducción de células T retrovirales o lentivirales, así como la transfección de ARNm. "Transfección de ARNm" se refiere a un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia para expresar transitoriamente una proteína de interés, como en el presente caso la proteína de fusión PD-1-CD28 de la presente invención, en una célula a transducir. En resumen, las células pueden electroporarse con el ARNm que codifica la proteína de fusión de la presente mediante el uso de un sistema de electroporación (tal como, por ejemplo, Gene Pulser, Bio-Rad) y luego cultivarse mediante el protocolo de cultivo de células estándar (por ejemplo, células T) como se describió anteriormente (véase Zhao y col, Mol Ther. 13(1) (2006), 151-159.) Preferentemente, la célula transducida de la invención es una célula T (más preferentemente una célula T CD8+) y se genera mediante transducción de células T lentivirales o más preferentemente retrovirales.

En este contexto, se conocen en la técnica vectores retrovirales adecuados para transducir células (por ejemplo,

células T) tales como SAMEN CMV/SRa (Clay y col., J. Immunol. 163 (1999), 507-513), LZRS-id3-IHRES (Heemskerk y col., J. Exp. Med. 186 (1997), 1597-1602), FeLV (Neil y col., Nature 308 (1984), 814-820), SAX (Kantoff y col., Proc. Nath Acad. Sci. usa 83 (1986), 6563-6567), pDOL (Desiderio, J. Exp. Med. 167 (1988), 372-388), N2 (Kasid y col. Proc. Nath Acad. Sci. usa 87 (1990), 473-477), LNL6 (Tiberghien y col., Blood 84 (1994), 1333-1341), pZipNEO (Chen y col., J. Immunol. 153 (1994), 3630-3638), LASN (Mullen y col., Hum. Gene Ther. 7 (1996), 1123-1129), pGIXsNa (Taylor y col., J. Exp. Med. 184 (1996), 2031-2036), LCNX (Sun y col., Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo y col., Blood 90 (1997), 952-957), LXSN (Sun y col., Hum. Gene Ther. 8 (1997), 1041-1048), SFG (Gallardo y col., Blood 90 (1997), 952-957), HMB-Hb-Hu (Vieillard y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 94 (1997), 11595-11600), pMV7 (Cochlovius y col., Cancer Immunol. Immunother. 46 (1998), 61-66), pSTITCH (Weitjens y col., Gene Ther 5 (1998), 1195-1203), pLZR (Yang y col., Hum. Gene Ther. 10 (1999), 123-132), pBAG (Wu y col., Hum. Gene Ther. 10 (1999), 977-982), rKat.43.267bn (Gilham y col., J. Immunother. 25 (2002), 139-151), pLGSN (Engels y col., Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pMP71 (Engels y col., Hum. Gene Ther. 14 (2003), 1155-1168), pGCSAM (Morgan y col., J. Immunol. 171 (2003), 3287-3295), pMSGV (Zhao y col., J. Immunol. 174 (2005), 4415-4423), o pMX (de Witte y col., J. Immunol. 181 (2008), 5128-5136). En el contexto de la presente invención, los vectores lentivirales adecuados para transducir células (por ejemplo, células T) son, por ejemplo, el vector lentiviral PL-SIN (Hotta y col., Nat Methods. 6(5) (2009), 370-376), pI56RRL-sinPPT-CMV-GFP-PRE/NheI (Campeau y col., PLoS One 4(8) (2009), e6529), pCMVR8.74 (Addgene Catalogue No.:22036), FUGW (Lois y col., Science 295(5556) (2002), 868-872, pLVX-EFI (Addgene Catalogue No.: 64368), pLVE (Brunker y col., Proc Natl Acad Sci U S A 111(9) (2014), E798-806), pCDHI-MCSI-EFI (Hu y col., Mol Cancer Res. 7(11) (2009), 1756-1770), pSLIK (Wang y col., Nat Cell Biol. 16(4) (2014), 345-356), pLJMI (Solomon y col., Nat Genet. 45(12) (2013), 1428-30), pLX302 (Kang y col., Sci Signal. 6(287) (2013), rs13), pHR-IG (Xie y col., J Cereb Blood Flow Metab. 33(12) (2013), 1875-85), pRRLSIN (Addgene Catalogue No.: 62053), pLS (Miyoshi y col., J Virol. 72(10) (1998), 8150-8157), pLL3.7 (Lazebnik y col., J Biol Chem. 283(7) (2008), 11078-82), FRIG (Raissi y col., Mol Cell Neurosci. 57 (2013), 23-32), pWPT (Ritz-Laser y col., Diabetologia. 46(6) (2003), 810-821), pBOB (Marr y col., J Mol Neurosci. 22(1-2) (2004), 5-11), o pLEX (n.º de catálogo Addgene: 27976).

La célula/células transducidas para el uso de la presente invención se cultivan preferentemente en condiciones controladas, fuera de su entorno natural. En particular, el término "cultivar" significa que las células (por ejemplo, las células transducidas como se describe en esta invención) que se derivan de eucariotas multicelulares (preferentemente de un paciente humano) se cultivan *in vitro*. El cultivo de células es una técnica de laboratorio para mantener vivas las células que se separan de su fuente de tejido original. En esta invención, la célula transducida como se describe en esta invención se cultiva en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión en o sobre dichas células transducidas. Las condiciones que permiten la expresión o un transgén (es decir, de la proteína de fusión como se describe en esta invención) se conocen comúnmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28 y la adición de citocinas tales como interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), interleucina 12 (IL-12) y/o interleucina 15 (IL-15). Después de la expresión de la proteína de fusión como se describe en esta invención en la célula transducida cultivada, la célula transducida se recupera (es decir, se vuelve a extraer) del cultivo (es decir, del medio de cultivo).

En esta invención también se describe una célula transducida que expresa una proteína de fusión codificada por una molécula de ácido nucleico de la invención que se puede obtener mediante el procedimiento de la presente invención.

En esta invención también se describe una composición farmacéutica/medicamento que comprende una célula transducida que expresa una proteína de fusión como se describe en esta invención o una célula transducida como se obtiene/produce mediante el procedimiento descrito anteriormente. En el contexto de la presente invención, dicha composición es una composición farmacéutica que comprende además, opcionalmente, formulaciones adecuadas de portadores, estabilizadores y/o excipientes.

De acuerdo con la presente invención, el término "medicamento" se utiliza indistintamente con el término "composición farmacéutica" y se refiere a una composición para su administración a un paciente, preferentemente un paciente humano. En el contexto de la presente invención, ese medicamento/composición farmacéutica se administrará a un paciente del que se aislaron/obtuvieron las células transducidas. En el contexto de la presente invención, el paciente se refiere a un paciente humano. Además, en el contexto de la presente invención, ese paciente padece una enfermedad caracterizada por expresar un ligando para PD-1 (es decir, PD-L1 y/o PD-L2). En el contexto de la presente invención, las enfermedades que se caracterizan por expresar un ligando para PD-1 (es decir, PD-L1 y/o PD-L2) son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, cáncer de pulmón (Dong y col., Nat Med. 8(8) (2002), 793-800), cáncer de ovario (Dong y col., Nat Med. 8(8) (2002), 793-800), melanoma (Dong y col., Nat Med. 8(8) (2002), 793-800), cáncer de colon (Dong y col., Nat Med. 8(8) (2002), 793-800), cáncer gástrico (Chen y col., World J Gastroenterol. 9(6) (2003), 1370-1373), carcinoma de células renales (Thompson y col., 104(10) (2005), 2084-91), carcinoma esofágico (Ohigashi y col., 11(8) (2005), 2947-2953), glioma (Wintterle y col., Cancer Res. 63(21) (2003), 7462-7467), cáncer urotelial (Nakanishi y col., Cancer Immunol Immunother. 56(8) (2007), 1173-1182), retinoblastoma

(Usui y col., Invest Ophthalmol Vis Sci. 47(10) (2006), 4607-4613), cáncer de mama (Ghebeh y col., Neoplasia 8(3) (2006), 190-198), linfoma no Hodgkin (Xerri y col., Hum Pathol. 39(7) (2008), 1050- 1058), carcinoma pancreático (Geng y col., J Cancer Res Clin Oncol. 134(9) (2008), 1021-1027), linfoma de Hodgkin (Yamamoto y col., Blood 111(6) (2008), 3220-3224), mieloma (Liu y col., Blood 110(1) (2007), 296-304), carcinoma hepatocelular (Gao y col., Clin Cancer Res. 15(3) (2009), 971-979), leucemia (Kozako y col., Leukemia 23(2) (2009), 375-382), carcinoma cervical (Karim y col., Clin Cancer Res. 15(20) (2009), 6341-6347), colangiocarcinoma (Ye y col., J Surg Oncol. 100(6) (2009), 500-504), cáncer oral (Malaspina y col., Cancer Immunol Immunother. 60(7) (2011), 965-974), cáncer de cabeza y cuello (Badoual y col., Cancer Res. 73(1) (2013), 128-138), o mesotelioma (Mansfield y col., J Thorac Oncol. 9(7) (2014), 1036-1040).

10

En el contexto de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende una célula transducida de la presente invención o una célula transducida producida por el procedimiento de la presente invención debe administrarse en combinación con protocolos de tratamiento intermedios. Los ejemplos de dichos protocolos de tratamiento intermedios incluyen, de modo no taxativo, la administración de analgésicos, la administración de agentes quimioterapéuticos, el manejo quirúrgico de la enfermedad o un síntoma de la misma. Por consiguiente, los regímenes de tratamiento como se describen en esta invención abarcan la administración de la célula transducida que expresa una proteína de fusión como se describe en esta invención junto con ninguno, uno o más de un protocolo de tratamiento adecuado para el tratamiento o prevención de una enfermedad, o un síntoma de esta, como se describe en esta invención o como se conoce en la técnica.

20

Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, las células transducidas que expresan la proteína de fusión de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, preferentemente cáncer. Más preferentemente, la célula transducida proporcionada en esta invención que expresa la proteína de fusión de la presente invención se utiliza para el tratamiento de una enfermedad (preferentemente un cáncer), en donde las células tumorales expresan un ligando para PD-1 (es decir, PD-L1 y/o PD-L2). Los tipos de cáncer que se tratan preferentemente con la célula transducida proporcionada en esta invención que expresa la proteína de fusión de la presente invención se describen anteriormente en esta invención. Por lo tanto, la célula transducida que expresa una proteína de fusión de la presente invención codificada por una molécula de ácido nucleico descrita en esta invención se puede utilizar en un procedimiento para tratar cualquier enfermedad en la que las células tumorales expresan un ligando para PD-1 (es decir, PD-L1 y/o PD-L2). El procedimiento de tratamiento implica preferentemente la recolección de células mediante un procedimiento descrito anteriormente como el aislamiento/recolección de las células mediante extracción de sangre o extracción de médula ósea. Posteriormente, las células aisladas se modifican viralmente o mediante electroporación de ARNm con el receptor de fusión (y opcionalmente se co-transducen con moléculas de ácido nucleico adicionales, por ejemplo, con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de células T o un receptor quimérico). Después de la expansión celular, como se describió anteriormente, las células se transfieren por vía intravenosa al paciente. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de enfermedades que comprende las etapas de aislar células (por ejemplo, células T, preferentemente células T CD8+) de un sujeto, transducir dichas células aisladas con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe anteriormente en esta invención, co-transducir dichas células aisladas con moléculas de ácido nucleico adicionales, por ejemplo, con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de células T o un receptor quimérico como se describe anteriormente, expandir las células transducidas y administrar las células transducidas de nuevo a dicho sujeto. Este procedimiento de tratamiento descrito en esta invención puede repetirse, por ejemplo, una o dos veces por semana.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en esta invención para significar generalmente obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de impedir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento", como se usa en esta invención, incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto e incluye: (a) impedir y/o mejorar la aparición de una enfermedad proliferativa (preferentemente cáncer) en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo, como la inhibición de la progresión del cáncer; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad, como la represión del cáncer. Preferentemente, el término "tratamiento", como se usa en esta invención, se refiere a la intervención médica de un trastorno ya manifestado, como el tratamiento de un cáncer diagnosticado.

55

Para los fines de la presente invención, el "sujeto" (o "paciente") puede ser un vertebrado. En el contexto de la presente invención, el término "sujeto" incluye tanto humanos como otros animales, particularmente mamíferos y otros organismos. Por lo tanto, los procedimientos proporcionados en esta invención son aplicables tanto a la terapia humana como a las aplicaciones veterinarias. Por consiguiente, dicho sujeto puede ser un animal tal como un ratón, rata, hámster, conejo, cobaya, hurón, gato, perro, pollo, oveja, especie bovina, caballo, camello o primate.

60

Preferentemente, el sujeto es un mamífero. Más preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Como se describió anteriormente, en esta invención se describe una "composición farmacéutica" que comprende la célula transducida proporcionada en esta invención que expresa la proteína de fusión de la presente invención (codificada por la molécula de ácido nucleico como se describe en esta invención). Dicha composición farmacéutica puede comprender además un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. El vehículo puede ser una solución que sea isotónica con la sangre del receptor. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular mediante procedimientos convencionales bien conocidos. El régimen de dosificación se determinará por el médico encargado y los factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos administrados conjuntamente. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar al sujeto a una dosis de 10^4 a 10^{10} células/kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal. En el contexto de la presente invención, la composición farmacéutica puede administrarse de tal manera que se realice un aumento de escala de las células a administrar comenzando con una dosis sujeta de aproximadamente 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal y a continuación subiendo a una dosis de 10^{10} células/kg de peso corporal. La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía intravenosa (es decir, por infusión intravenosa) pero también por vía intraperitoneal, intrapleural, intratecal, subcutánea o intranodal. Portadores intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y conservantes similares y otros aditivos también pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la presente invención, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse en coterapia junto con, por ejemplo, moléculas capaces de proporcionar una señal de activación para células efectoras inmunitarias, para la proliferación celular o para la estimulación celular. Dicha molécula puede ser, por ejemplo, una señal de activación primaria adicional para células T (por ejemplo, una molécula coestimuladora adicional: moléculas de la familia B7, Ox40L, 4.1 BBL, CD40L, anti-CTLA-4, anti-PD-1), o una interleucina de citocina adicional (por ejemplo, IL-2).

En el contexto de la presente invención, los componentes de la composición farmacéutica que se utilizarán para la administración terapéutica son preferentemente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse poniendo en contacto los componentes de la composición farmacéutica uniformemente con portadores líquidos. Después de su producción, la composición farmacéutica de la invención puede colocarse en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades que se caracterizan por expresar un ligando para PD-1 (es decir, PD-L1 y/o PD-L2) tal como, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de colon, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, carcinoma esofágico, glioma, cáncer urotelial, retinoblastoma, cáncer de mama, linfoma no Hodgkin, carcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, mieloma, carcinoma hepatocelular, leucemia, carcinoma cervical, colangiocarcinoma, cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello o mesotelioma que comprende la administración de una célula transducida como se describe en esta invención a un sujeto. En el contexto de la presente invención, dicho sujeto es un ser humano (como se explicó anteriormente). En el contexto de la presente invención, se describe un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad que comprende las etapas de aislar células (por ejemplo, células T, preferentemente células T CD8+) de un sujeto, transducir dichas células aisladas con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describió anteriormente en esta invención, y administrar las células transducidas a dicho sujeto. En el contexto de la presente invención, dichas células transducidas se administran a dicho sujeto mediante infusión intravenosa. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de enfermedades que comprende las etapas de aislar células (por ejemplo, células T, preferentemente células T CD8+) de un sujeto, transducir dichas células aisladas con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe anteriormente en esta invención, co-transducir dichas células aisladas con moléculas de ácido nucleico adicionales, por ejemplo, con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de células T o un receptor quimérico como se describe anteriormente, expandir las células transducidas y administrar las células transducidas de nuevo a dicho sujeto.

La etapa de expansión mencionada anteriormente de las células transducidas se puede realizar en presencia de citocinas (estimulantes) tales como interleucina-2 (IL-2) y/o interleucina-15 (IL-15). En el contexto de la presente

invención, la etapa de expansión también se puede realizar en presencia de interleucina-12 (IL-12), interleucina-7 (IL-7) y/o interleucina-21 (IL-21). Según la presente invención, la etapa de expansión de las células transducidas también se puede realizar en presencia de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28.

5 Las proteínas de fusión PD-1-CD28 como se describen en esta invención también se pueden combinar con otros polipéptidos modificados como se describe en esta invención o como se conoce en la técnica. Dichas combinaciones incluyen la coexpresión de las proteínas de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención y polipéptidos modificados en la misma población celular y/o dentro de la misma célula. Por consiguiente, la combinación en el contexto de la proteína de fusión PD1-CD28 con otro polipéptido modificado puede referirse a una población celular
10 que, como un todo, expresa una o más proteínas de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención y uno o más polipéptidos modificados, donde las células individuales dentro de la población se han modificado de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica o como se describe en esta invención para expresar (a) una o más de una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención o uno o más polipéptidos modificados; o (b) una o más de una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención y uno o más polipéptidos
15 modificados.

Se prefiere que la combinación de una o más proteínas de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención y uno o más polipéptidos modificados sea coexpresión dentro de la misma célula, de modo que la célula exprese simultáneamente tanto la una o más proteínas de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención y el uno o
20 más polipéptidos modificados y/o de modo que la expresión de tanto la una o más proteínas de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención y el uno o más polipéptidos modificados se pueda detectar dentro de la misma célula.

Polipéptidos modificados genéticamente que se pueden coexpresar con una o más proteínas de fusión PD1-CD28 de
25 la invención incluyen

- receptores de antígenos quiméricos tales como los descritos en Milone y col., Mol. Ther. 17(2009), 1453-1464; Carpenito y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106(2009), 3360-3365; Wang y col., Hum. Gene Ther. 18(2007), 712-725; Pule y col., Mol. Ther. 12(2005), 933-941; y Wang y col., Cancer Immunol. Res. 3(2015), 815-826;
30
- Células T modificadas genéticamente de TCR alfa/beta, tal como se proporciona en Rapoport y col., Nature Medicine, 21(2015), 914-921;
- TCR naturales expresados en til, tal como se proporciona en Rosenberg y col., Clin. Cancer Res. 17(2011), 4550-4557;
35
- Acopladores de células T anti-CD3 expresados como polipéptido soluble o presentados como proteína transmembrana en la superficie celular; y
- Proteínas de fusión (TFP) del receptor de células T (TCR) que comprenden una subunidad de TCR y un dominio de anticuerpo humano o humanizado. Por ejemplo, como se conoce en la técnica, la subunidad de TCR puede comprender un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana de TCR y/o un dominio intracelular de TCR.
40

45 Cuando la proteína de fusión PD1-CD28 y el polipéptido modificado van a coexpresarse en la misma célula, la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención y el segundo polipéptido pueden codificarse por diferentes ácidos nucleicos que se introducen ambos en la misma célula. Por lo tanto, también se describe en esta invención una composición que comprende un ácido nucleico que codifica una o más de una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO.:14 o SEQ ID NO.:24, preferentemente SEQ ID NO:24) y un
50 ácido nucleico que codifica uno o más modificados genéticamente (segundo polipéptido como se comprende en esta invención). También se describe en esta invención una composición que comprende un primer y segundo vector, el primer vector comprende un ácido nucleico que codifica uno o más de una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:24, preferentemente SEQ ID NO:24) y el segundo vector comprende un ácido nucleico que codifica uno o más modificados (segundo polipéptido como se
55 comprende en esta invención). El primer y segundo vectores pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, como se conoce en la técnica, el primer y segundo vectores (que comprenden ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:24, preferentemente SEQ ID NO:24) y el uno o más polipéptidos modificados genéticamente (segundo), respectivamente) pueden ser el mismo vector (*por ejemplo*, el mismo vector de expresión) pero para el inserto que codifica la proteína
60 de fusión PD1-CD28 o el (segundo) polipéptido modificado genéticamente. De manera alternativa, el primer y el

segundo vector pueden ser vectores diferentes, *por ejemplo*, que comprenden diferentes promotores de expresión. Por lo tanto, la expresión de los polipéptidos codificados a partir del primer y segundo vectores puede ser impulsada por el mismo o diferentes promotores. Por consiguiente, también se describe en esta invención una composición que comprende (a) un primer ácido nucleico que comprende un primer promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención, y/o un primer vector que comprende el primer ácido nucleico; y (b) un segundo ácido nucleico que comprende un segundo promotor unido operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un (segundo) polipéptido modificado, donde el primer y segundo vectores, y/o el primer y segundo promotores, son iguales o diferentes.

- 10 De manera alternativa, cuando la proteína de fusión PD1-CD28 y el polipéptido modificado van a coexpresarse en la misma célula, la proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención y el segundo polipéptido pueden codificarse por el mismo ácido nucleico, *es decir*, un único ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de fusión como se describe en esta invención y una secuencia que codifica el segundo polipéptido. Por lo tanto, también se describe un único ácido nucleico que comprende una proteína de fusión PD1-CD28 descrita en esta invención y/o un polipéptido modificado como se describió anteriormente. Un único ácido nucleico que comprende tanto el gen que codifica la proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención como el gen que codifica el polipéptido coexpresado se puede usar de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica o descritos en esta invención para la replicación/duplicación del ácido nucleico y/o componentes del mismo (*por ejemplo*, replicación de las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido PD1-CD28 y/o modificado genéticamente), se puede usar para modificar el ácido nucleico y/o componentes del mismo, o se puede usar para expresar las proteínas codificadas por separado o simultáneamente. Por consiguiente, también se describe un ácido nucleico que comprende un gen que codifica una proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO.:14 o SEQ ID NO.:24, preferentemente SEQ ID NO.:24) y un gen que codifica un polipéptido modificado (*por ejemplo*, un receptor de antígeno quimérico, un receptor de células T alfa/beta, un receptor de células T natural, un acoplador de células T anti-CD3 expresado como polipéptido soluble o presentado como proteína transmembrana en la superficie celular, y/o una proteína de fusión (TFP) del receptor de células T (*por ejemplo*, que comprende una subunidad de TCR y un dominio de anticuerpo humano o humanizado) como se describió anteriormente). También se describe en esta invención un vector que comprende un ácido nucleico que comprende un gen que codifica una proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:24, preferentemente SEQ ID NO:24), un gen que codifica un polipéptido modificado (*por ejemplo*, un receptor de antígeno quimérico, un receptor de células T alfa/beta, un receptor de células T natural, un acoplador de células T anti-CD3 expresado como polipéptido soluble o presentado como proteína transmembrana en la superficie celular, y/o una proteína de fusión (TFP) del receptor de células T (*por ejemplo*, que comprende una subunidad de TCR y un dominio de anticuerpo humano o humanizado) como se describe anteriormente) y/o que comprende tanto un gen que codifica una proteína de fusión PD-1-CD28 como se describe en esta invención como un gen que codifica un (segundo) polipéptido modificado como se describe en esta invención. También se describe una célula hospedadora que comprende uno o más ácidos nucleicos y/o vectores como se describe en este párrafo.

- Cuando la una o más proteínas de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO.: 14 o SEQ ID NO.:24, preferentemente SEQ ID NO:24) y el uno o más polipéptidos modificados genéticamente (segundo) se van a coexpresar en la misma célula a partir de un único ácido nucleico, la expresión de la proteína de fusión PD-1-CD28 y el segundo polipéptido se puede impulsar independientemente por promotores idénticos o diferentes. Los promotores se pueden organizar de forma bidireccional en configuraciones divergentes que coordinan la regulación de dos o más transgenes (vectores promotores bidireccionales como se conoce en la técnica). Los promotores también se pueden disponer en una orientación unidireccional (vectores promotores duales) que coordinan independientemente la regulación de dos o más transgenes como se conoce en la técnica. Por consiguiente, también se describe un ácido nucleico que comprende un primer promotor unido operativamente a una secuencia que codifica una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención y un segundo promotor unido operativamente a un segundo polipéptido, donde el primer y el segundo promotor son iguales o diferentes. De manera alternativa, la proteína de fusión PD-1-CD28 y el segundo polipéptido que se coexpresa pueden estar bajo el control de un único promotor (*es decir*, el mismo). Las diferentes proteínas pueden modificarse para expresarse bajo el control del mismo promotor usando cualquier procedimiento conocido en la técnica o descrito en esta invención. Por ejemplo, como se conoce bien en la técnica, el gen que codifica la primera proteína (*por ejemplo*, una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO.: 14 o SEQ ID NO.:24, preferentemente SEQ ID NO:24)) puede ligarse a una secuencia que codifica un péptido 2A o secuencias similares a 2A (*por ejemplo*, Szymczak y col., Nature Biotechnol. 22(2004), 589-594; Provost y col, Genesis 45(2007), 625-629; Diao y White, Genetics 190(2012), 1139-1144, seguido del segundo polipéptido. De manera alternativa, la proteína de fusión como se describe en esta invención y las segundas secuencias codificantes de polipéptidos pueden estar unidas por un IRES (sitio interno de entrada ribosómica).

60

Los ácidos nucleicos tal como se proporcionan en esta invención (que incluyen vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos) se pueden introducir en células diana mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Tales procedimientos incluyen, entre otros, el procedimiento de lípidos catiónicos o el procedimiento de liposomas, la electroporación o el procedimiento de fosfato de calcio. Como se usa en esta invención, las células en las que se introducen los ácidos nucleicos y/o vectores también se denominan "células transducidas".

La coexpresión de la proteína de fusión PD1-CD28 y el segundo polipéptido puede ser independientemente constitutiva o constitucional, dependiendo del sistema utilizado. La proteína de fusión PD-1-CD28 y el segundo polipéptido se pueden expresar en la superficie de la célula transducida proporcionada en esta invención o se pueden detectar de otro modo dentro o sobre la célula de acuerdo con los procedimientos estándar conocidos en la técnica. La célula transducida para la coexpresión de una PD1-CD28 como se describe en esta invención y un segundo polipéptido puede ser, *por ejemplo*, una célula T CD4+, una célula T CD8+, una célula T $\gamma\delta$, una célula T citolítica natural (NK), una célula citolítica natural (NK), una célula linfocitaria infiltrante de tumor (TIL), una célula mieloide o una célula madre mesenquimal. Preferentemente, la célula transducida proporcionada en esta invención para la coexpresión es una célula T (por ejemplo, una célula T autóloga), más preferentemente, la célula transducida es una célula T CD8+ o una célula T CD4+. Por consiguiente, la célula transducida puede ser una célula T CD8+ que coexpresa tanto una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:24, preferentemente SEQ ID NO:24) como un segundo polipéptido (*por ejemplo*, un receptor de antígeno quimérico, un receptor de células T alfa/beta, un receptor de células T naturales, un activador de células T anti-CD3 expresado como polipéptido soluble o presentado como proteína transmembrana en la superficie celular, y/o una proteína de fusión del receptor de células T (TCR) (TFP) (*por ejemplo*, que comprende una subunidad de TCR y un dominio de anticuerpo humano o humanizado) como se describió anteriormente). Además, la célula transducida para la coexpresión puede ser una célula T autóloga o una célula T alogénica como se describe en esta invención. De manera alternativa o adicional, la célula transducida puede ser una célula T CD4+ que coexpresa tanto una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención (*por ejemplo*, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:24, preferentemente SEQ ID NO:24) como un segundo polipéptido (*por ejemplo*, un receptor de antígeno quimérico, un receptor de células T alfa/beta, un receptor de células T naturales, un acoplador de células T anti-CD3 expresado como polipéptido soluble o presentado como proteína transmembrana en la superficie celular, y/o una proteína de fusión (TFP) del receptor de células T (*por ejemplo*, que comprende una subunidad de TCR y un dominio de anticuerpo humano o humanizado) como se describió anteriormente). La célula T CD4+ transducida puede ser una célula T CD4+ autóloga o una célula T CD4+ alogénica. De manera alternativa o adicional, también se describen en esta invención poblaciones de células T CD4+ y/o células T CD8+ transducidas (que incluyen, de modo no taxativo, poblaciones que comprenden células T CD4+ transducidas, poblaciones que comprenden células T CD8+ transducidas y poblaciones que comprenden células T CD4+ transducidas y células T CD8+ transducidas), en donde cada una de las células transducidas expresa una proteína de fusión PD1-CD28 como se describe en esta invención, un (segundo) polipéptido modificado como se describe anteriormente, o expresa tanto una proteína de fusión PD1-CD28 de la invención como un (segundo) polipéptido modificado como se describe anteriormente. La población de células T CD4+ y/o CD8+ transducidas que se coexpresan puede ser autóloga y/o alogénica (*por ejemplo*, la población puede comprender solo células autólogas, solo células alogénicas o combinaciones de células autólogas y alogénicas). Las poblaciones de coexpresión de células T como se describen en esta invención pueden comprender células T transducidas y no transducidas, de modo que la población en su conjunto exprese o una muestra representativa de la población exprese tanto una proteína de fusión PD1-CD28 como un (segundo) polipéptido modificado como se describió anteriormente.

También se describe en esta invención un kit que comprende la molécula de ácido nucleico como se describe en esta invención, el vector como se describe en esta invención y/o la proteína de fusión como se describe en esta invención. Por lo tanto, los procedimientos de tratamiento proporcionados en esta invención pueden realizarse mediante el uso de este kit. Ventajosamente, el kit como se describe en esta invención comprende además opcionalmente (a) tampón(es) de reacción, soluciones de almacenamiento (es decir, conservantes), soluciones de lavado y/o reactivos o materiales restantes necesarios para la realización de los ensayos como se describe en esta invención. Además, partes del kit se pueden envasar individualmente en viales o botellas o en combinación en recipientes o unidades de múltiples recipientes. Además, el kit puede contener instrucciones de uso. La fabricación del kit sigue preferiblemente procedimientos estándar que son conocidos por el experto en la materia. Como se mencionó anteriormente, el kit proporcionado en esta invención es útil para tratar a un sujeto (preferentemente un paciente humano) que tiene una enfermedad que se caracteriza por expresar un ligando para PD-1 (es decir, PD-L1 y/o PD-L2) tal como, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de colon, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, carcinoma esofágico, glioma, cáncer urotelial, retinoblastoma, cáncer de mama, linfoma no Hodgkin, carcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, mieloma, carcinoma hepatocelular, leucemia, carcinoma cervical, colangiocarcinoma, cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello o mesotelioma.

Las figuras muestran

Figura 1: Caracterización *in vitro* de la proteína de fusión PD-1-CD28 (dominio transmembrana PD-1, proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)) y 14 (proteína))

5 **(A)** Proteína de fusión PTM (como se representa en las SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)), células T primarias murinas/de ratón transducidas o no transducidas se estimularon con anticuerpo anti-CD3, anti-CD3 más anticuerpos anti-CD28 o con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) y la liberación de IFN- γ resultante se midió mediante ELISA. **(B)** Células T murinas primarias transducidas o no transducidas con proteína de fusión de PTM se dejaron sin estimular o se estimularon con anticuerpo anti-CD3 o con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante y la fosforilación de AKT se midió mediante citometría de flujo. **(C)** Células T murinas primarias transducidas o no transducidas con proteína de fusión PTM se estimularon con anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 o con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) y los números de células se normalizaron a perlas de recuento estandarizadas. **(D)** La proteína de fusión de PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) o las células T murinas primarias no transducidas se estimularon con anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 o con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) durante 24 h y se tiñeron intracelularmente para el marcador de mitosis ki67. **(E)** La proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) o las células T OT-1 no transducidas se cocultivaron con Panc02-OVA-PD-L1 en presencia o ausencia de anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo SIINFEKL H2kb anti-ratón y la producción de IFN- γ resultante se midió mediante ELISA. **(F)** La proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) o las células T OT-1 no transducidas se preestimularon con anticuerpo anti-CD3 y con PD-L1 recombinante. Mientras tanto, se sembraron células Panc02-OVA-PD-L1 y se cultivaron antes de la adición de células T preestimuladas (flecha). Las condiciones son las siguientes: Panc02-OVA-PD-L1 solo (1), Panc02-OVA-PD-L1 + células T no transducidas preestimuladas (2), Panc02-OVA-PD-L1 + células T transducidas con proteína de fusión PTM preestimulada (3), proteína de fusión PTM (4) y células T no transducidas (5) y medio (6). La viabilidad de las células Panc02-OVA se midió mediante una medición basada en la impedancia. Los experimentos A a E son representativos de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. El experimento F es representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado por razones técnicas. Las barras representan la desviación estándar (DE) y se muestran los valores p de la prueba t de Student. Todas las pruebas eran de dos caras.

Figura 2: Comparación funcional de diferentes proteínas de fusión PD-1-CD28

(A) Descripción esquemática de la estructura de las diferentes proteínas de fusión PD-1-CD28: PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)): dominio extracelular de PD-1 (PD-I-ex) y dominio transmembrana (PD-1-trans) (como se representa en SEQ ID NO: 5 (ácido nucleico (ADNc)); 6 (proteína)) fusionado al dominio intracelular de CD28 (CD28-intra; SEQ ID NO: 11 (ácido nucleico (ADNc)); 12 (proteína)). CTM (SEQ ID NO: 43 (ácido nucleico (ADNc)); 44 (proteína)): dominio extracelular de PD-1 (SEQ ID NO: 39 (ácido nucleico (ADNc)); 40 (proteína)) fusionado al dominio transmembrana (CD28-trans) e intracelular de CD28 (SEQ ID NO: 41 (ácido nucleico (ADNc)); 42 (proteína)); y CEX (SEQ ID NO: 49 (ácido nucleico (ADNc)); 50 (proteína)): dominio extracelular de PD-1 (SEQ ID NO: 45 (ácido nucleico (ADNc)); 46 (proteína)) fusionado al segmento extracelular de CD28 (CD28-ex) y al dominio transmembrana e intracelular de CD28 (SEQ ID NO: 47 (ácido nucleico (ADNc)); 48 (proteína)). **(B)** Se estimularon células T murinas primarias PTM- (SEQ ID NO: 49, 50), CTM- (SEQ ID NO: 43, 44), CEX (SEQ ID NO: 49, 50) o no transducidas con anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 o anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) y se midió la producción de IFN- γ mediante ELISA. **(C)** Células T murinas primarias transducidas o no transducidas con proteína de fusión PTM, CTM, CEX se estimularon con anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 o anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) y los números de células resultantes se normalizaron para contar perlas. **(D)** Se incubaron células T transducidas o no transducidas con proteína de fusión PTM, CTM, CEX con PD-L1 37 recombinante (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) y se midió la unión de PD-L1 mediante citometría de flujo. **(E)** Cotinción representativa para la expresión de CD8 y PD-1 de células T PTM, CTM, CEX o no transducidas. Todos los experimentos son representativos de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Las barras representan la DE y se muestran los valores p de la prueba t de Student. Todas las pruebas eran de dos caras.

Figura 3: Comparación funcional de diferentes proteínas de fusión PTM mutadas en sus supuestos dominios de señalización.

(A) Descripción esquemática de los diferentes mutantes de la proteína de fusión PTM: PTM (YMN-M-PYAP, tipo salvaje (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)), PTM-FMNM (mutado con tirosina, Y a F (SEQ ID NO: 51 (ácido nucleico (ADNc)); 52 (proteína)), PTM-AYAA (mutado con prolina, P a A (SEQ ID NO: 53 (ácido nucleico (ADNc)); 54 (proteína)) y PTM-FMNM-AYAA (mutado con prolina y tirosina (SEQ ID NO: 55 (ácido nucleico (ADNc));

56 (proteína)). **(B)** Se estimularon PTM (SEQ ID NO: 13, 14), PTM-tirosina mutada (PTM-FMNM; SEQ ID NO: 51, 52), PTM-prolina mutada (PTM-AYAA; SEQ ID NO: 53, 54) y PTM-tirosina y prolina mutada (PTM-FMNM-AYAA; SEQ ID NO: 55, 56) o células T no transducidas con anticuerpo anti-CD3 o con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) y se midió la producción de IFN- γ mediante ELISA. **(C)** Células T transducidas sin transducir, PTM-, PTM-FMNM-, PTM-AYAA- o PTM-FMNM-AYAA- se estimularon con anticuerpo anti-CD3 o anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante y la cantidad de células viables se cuantificó mediante normalización para contar perlas. **(D)** PTM no transducida (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico); 14 (proteína))- PTM-FMNM (SEQ ID NO: 51 (ácido nucleico (ADNc)); 52 (proteína))- PTM-AYAA (SEQ ID NO: 53 (ácido nucleico (ADNc)); 54 (proteína))- o PTM-FMNM-AYAA (SEQ ID NO: 55 (ácido nucleico (ADNc)); 56 (proteína)) - las células T transducidas se estimularon con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)) y la liberación de citocinas se analizó semicuantitativamente utilizando una matriz de citocinas murinas. La matriz analiza la expresión de un amplio panel de 40 citocinas. Los valores de P por debajo de 0,05 se marcan con * en la Figura 3D. Los experimentos B y C son representativos de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. El experimento C se realizó tres veces por duplicado por razones técnicas. Las barras representan la desviación estándar y se muestran los valores p de la prueba t de Student. Todas las pruebas eran de dos caras.

Figura 4: Eficacia terapéutica de células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM *in vivo* e inducción de memoria inmunológica

(A) Se inyectaron 18 ratones por vía subcutánea con células Panc02-OVA. Una vez que se establecieron los tumores, se aleatorizaron 6 ratones cada uno a ningún tratamiento, a transferencia adoptiva de células T OT-1 no transducidas o a transferencia adoptiva de células T OT-1 transducidas con proteína PTM. El tamaño del tumor se midió a ciegas cada dos días. El experimento es representativo de tres experimentos independientes con 6 ratones por grupo. **(B)** Los ratones supervivientes (n = 12) de dos experimentos independientes se volvieron a desafiar con células Panc02-OVA al mismo tiempo que los ratones de tipo salvaje sin tumor (n = 7). **(C)** Los ratones supervivientes después de la primera reexposición (n = 11, del experimento representado en el panel B) y los ratones de tipo salvaje sin tumor (n = 6) se reexpusieron con una dosis subletal de células Panc02. **(D)** Los ganglios linfáticos de los ratones supervivientes de la reexposición a Panc02 (experimento representado en el panel C) se estimularon en cultivo de órganos *in vitro* con el péptido de control TRP2, el péptido P15E o el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 65, en referencia a los aminoácidos (AA) 258-265 de la ovoalbúmina de pollo (Entrada Uni Prot: P01012 (versión 147 de la entrada y versión 2 de la secuencia))). El número de células T CD8+ productoras de IFN- γ se analizó mediante citometría de flujo y se normalizó al número de células T CD8+ productoras de IFN- γ después de la estimulación con TRP2 para cada ratón. **(E)** Los esplenocitos de ratones que habían eliminado los tumores Panc02-OVA después de la transferencia de células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM o de ratones de tipo salvaje se transfirieron de forma adoptiva en ratones de tipo salvaje. Estos ratones se expusieron a células Panc02-OVA. La transferencia de esplenocitos de ratones sin tumor impidió el crecimiento del tumor en 3 de 9 ratones. El análisis de supervivencia se realizó utilizando la prueba de rango logarítmico. Para la comparación de las condiciones experimentales de ratones individuales, se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Todas las pruebas eran de dos caras.

Figura 5: Modo de acción *in vivo* de células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM

(A) Se inyectaron 18 ratones por vía subcutánea con células Panc02-OVA. Una vez que se establecieron los tumores, los ratones se aleatorizaron para la transferencia adoptiva de células T OT-1 no transducidas o de células T transducidas con un receptor PD-1 eliminado (SEQ ID NO: 57 (ácido nucleico (ADNc)); 58 (proteína)) o con proteína de fusión PTM no modificada (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)). El tamaño del tumor se midió cada dos días de forma ciega. El experimento es representativo de tres experimentos independientes con 6 ratones por grupo. **(B)** Células T de ratones CD45.1-OT-1 se transdujeron con proteína de fusión PTM y las células T de ratones CD90.1-OT-1 se dejaron sin transducir. Las células T se coinyectaron en cantidades iguales en ratones de tipo salvaje (n = 2) o en ratones con tumores Panc02-OVA (n = 6). Cuatro días después, se analizaron las células T en los diferentes compartimentos y se comparó la proporción de proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico); 14 (proteína)) transducida a células OT-1-T no transducidas. El experimento es representativo de tres experimentos independientes con 6 ratones por grupo con tumor. **(C)** Se aislaron células T CD90.1-OT-1-T no transducidas y proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico); 14 (proteína)), células T CD45.1-OT-1 transducidas de tumor, bazo y ganglios linfáticos obtenidos en el experimento (B) y se analizaron para determinar la expresión de IFN- γ mediante citometría de flujo. El experimento es representativo de tres experimentos independientes con 6 ratones por grupo con tumor. **(D)** Se transdujeron células T CD45.1-OT-1 con proteína de fusión PTM, se transdujeron células T CD90.1 OT-1 con cualquiera de las proteínas de fusión mutantes PTM-FMNM (SEQ ID NO: 52 (proteína), 51 (ADNc)), PTM-AYAA (SEQ ID NO: 54 (proteína), 53 (ADNc)) o PTM-FMNM-AYAA (SEQ ID NO: 56 (proteína), 55 (ADNc)) y se mezclaron en cantidades iguales con células T CD45.1 OT-1 transducidas con PTM antes de la transferencia a ratones

con tumor Panc02- OVA (n = 3 por grupo). Cuatro días después de la transferencia, se analizó la relación de células T transducidas con receptor de PTM a células T transducidas con proteína de fusión mutante mediante citometría de flujo. El experimento es representativo de tres experimentos independientes con 3 ratones por grupo con tumor. **(E)** Células T OT-1 transducidas o no transducidas con la proteína de fusión PTM se transfirieron de forma adoptiva en 5 ratones portadores de tumores Panc02-OVA (n = 17, respectivamente). Una semana después, se analizó el número de MDSC infiltradas por tumores (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6⁺, Gr-1 intermedio⁺). Los datos representan los resultados de ratones agrupados de tres experimentos independientes. Las barras representan la DE. El análisis de supervivencia se realizó utilizando la prueba de rango logarítmico. Para la comparación de las condiciones experimentales de ratones individuales, se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Todas las pruebas eran de dos caras.

10

Figura 6: Justificación del uso de una proteína de fusión PDI-CD28 (PTM; SEQ ID NO: 13 (ADNc), 14 (proteína): regulación positiva de PD1 por células T intratumorales y expresión de PD-L1 en la célula tumoral

(A) Células T OT-1 transducidas con GFP se transfirieron de forma adoptiva a ratones con tumor Panc02-OVA. Una 15 semana después, se analizó la infiltración del tumor, así como del bazo, por parte de las células T GFP⁺ OT-1 y la expresión de PD-1 de las células T infiltrantes mediante citometría de flujo. Casi todas las células T OT-1 que se infiltraron en el tumor fueron positivas para PD-1 en contraste con las células T OT-1 en el bazo. **(B)** Histogramas ejemplares de expresión de PD-1 en células OT-1-T infiltrantes de tumor (gris oscuro) y células OT-1-T infiltrantes de bazo (gris claro). **(C)** Las células Panc02-OVA se estimularon *in vitro* con IFN- γ (2, 20 y 100 ng/ml) y la expresión de 20 PD-L1 se analizó mediante citometría de flujo 48 h después. IFN- γ reguló al alza la expresión de PD-L1 de forma dependiente de la dosis. **(D)** Histogramas de ejemplo de expresión de PD-L1 en células tumorales Panc02-OVA después de la estimulación con 100 ng/ml de IFN- γ (gris oscuro) y sin estimulación (gris claro). **(E)** Descripción esquemática del mecanismo de acción: la proteína de fusión del dominio extracelular y transmembrana de PD-1 con el dominio intracelular de CD28 protege a las células T específicas del antígeno de la anergia mediada por PD-1-PD- 25 L1 y para convertir la señal inhibitoria en una coestimulación. **(F)** Se estimularon células T transducidas con proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) con anticuerpo anti-CD3, PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ADNc), 38 (proteína)) o ambos. La inducción de IL-2 se analizó 48 h más tarde mediante ELISA. La estimulación combinada con ambos compuestos conduce a una fuerte inducción de IL-2.

30 **Figura 7: Eficacia terapéutica de las células T transducidas con la proteína de fusión PD1-CD28 (PTM; SEQ ID NO: 13 (ADNc), 14 (proteína)) en el modelo Panc02-OVA que sobreexpresa PD-L1 y la dependencia del efecto del tratamiento del IFN- γ**

(A) Se estimularon células T transducidas con proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico); 14 (proteína)) 35 con anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28, PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico); 38 (proteína)), anticuerpo anti-CD3 y PD-L1 recombinante o los tres estímulos. La inducción de IFN- γ se analizó 48 h más tarde mediante ELISA. La estimulación combinada con todos los compuestos conduce a una fuerte inducción de IFN- γ . **(B)** Las células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ADNc), 14 (proteína)) se cocultivaron con Panc02-PD-L1 en presencia o ausencia de anticuerpo anti-CD3 (1 μ g/ml) durante 48 h y se cuantificó IFN- γ en el 40 sobrenadante. **(C)** 24 ratones se inyectaron por vía subcutánea con células Panc02-OVA-PD-L1. Una vez que se establecieron los tumores, los ratones (n = 8 por grupo) se aleatorizaron para permanecer sin tratar o ser tratados dos veces con células T OT-1 no transducidas o células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ADNc), 14 (proteína)). El tamaño del tumor se midió cada dos días de forma ciega. Células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM aumentaron significativamente el número de ratones sin tumor en comparación con los dos 45 grupos de control. **(D)** Se inyectaron 10 ratones por vía subcutánea con células Panc02-OVA. Una vez que se establecieron los tumores, los ratones (n = 5 por grupo) se aleatorizaron para ser tratados con células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM junto con 200 μ g de anticuerpo neutralizante de IFN- γ o control de isotipo. Los anticuerpos se aplicaron i.p. cada tres días durante cuatro dosis desde el momento de la aleatorización. El tamaño del tumor se midió cada dos días de forma ciega. Los anticuerpos neutralizantes de IFN- γ anularon el impacto 50 terapéutico de las células T OT-1 transducidas con PTM. **(E)** Células T OT-1 transducidas o no transducidas con la proteína de fusión PTM se transfirieron de forma adoptiva a ratones con tumor Panc02-OVA (n = 17, respectivamente). Una semana después, se cuantificó el número de células T reguladoras infiltrantes de tumores y el número de células T PD-1-CD8 en el tumor. Los ratones tratados con células T transducidas con proteína de fusión PTM tuvieron una mayor relación de células T PD-1-CD8 a Treg que los ratones tratados con células T no transducidas. Las barras 55 representan SEM.

Figura 8: Análisis funcional de la proteína de fusión PD-I-CD28 humana (hPTM; SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico), 24 (proteína))

60 hPTM (SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico); 24 (proteína))- o células T humanas primarias no transducidas se estimularon

con anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 o anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (adquirido de R&D, N.º de catálogo: 156-B7-100) y la producción de IFN- γ se midió mediante ELISA. Las diferencias entre los grupos de estimulación se evaluaron mediante la prueba t de Student no emparejada. Las flechas muestran SEM y los valores p exactos se representan en la Figura.

5

Figura 9: Caracterización *in vitro* de la proteína de fusión PD-1-CD28 (dominio transmembrana PD-1, proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)) y 14 (proteína)) células T CD4+ transducidas

La proteína de fusión de PTM (como se representa en las SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína))- las células T CD4+ murinos/de ratón primarios transducidas o no transducidas se estimularon con anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 o con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)).

(A) La liberación de IFN- γ se midió mediante ELISA.

15

(B) La proliferación se determinó mediante células/perlas viables. Los números de células se normalizaron a perlas de recuento estandarizadas.

(C) Viabilidad, tinte de viabilidad fijable (AmCyan, BioLegend) por citometría de flujo.

20

(D) Tinción intracelular del marcador de mitosis ki67.

(E) Tinción intracelular del marcador de transcripción/activación EOMES.

Los experimentos A a E son representativos de al menos dos experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. Las barras representan la DE. Todas las pruebas eran de dos caras.

25

Figura 10: Caracterización fenotípica *in vitro* de la proteína de fusión PD-1-CD28 (dominio transmembrana PD-1, proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)) y 14 (proteína)) células T CD4+ transducidas

La proteína de fusión de PTM (como se representa en las SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína))- las células T CD4+ murinos/de ratón primarios transducidas o no transducidas se estimularon con anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 o con anticuerpo anti-CD3 más PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 37 (ácido nucleico (ADNc)); 38 (proteína)).

(A) La expresión de IL-17 se evaluó mediante tinción anti-IL17 (FITC, clon TC11-18H10.1, BioLegend) y se midió mediante citometría de flujo.

(B) La expresión de FoxP3 se evaluó mediante tinción anti-FoxP3 (PE, clon 150D, BioLegend) y se midió mediante citometría de flujo.

40

Los experimentos A y B son representativos de al menos dos experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. Las barras representan la DE. Todas las pruebas eran de dos caras.

Figura 11: Caracterización fenotípica *in vitro* de la proteína de fusión PD-1-CD28 (dominio transmembrana PD-1, proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)) y 14 (proteína)) células T transducidas

45

Las PTM preestimuladas específicas de antígeno (OVA) (como se ilustra en las SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) transducidas o no transducidas de células T murinas primarias se cocultivaron con células tumorales PancOVA. El punto de tiempo 1 es después de 36 h de estimulación con anticuerpo anti-CD3e agonista y PD-L1 murino recombinante. El punto de tiempo 2 es después de 12 h de cocultivo posterior con células PancOVA.

50

(A) Porcentaje de células CD8+ CD62L- CCR7- viables.

(B) Porcentaje de células CD8+ CD62L+ CCR7+ viables.

55

(C) Porcentaje de células CD4+ CD62L- CCR7- viables.

(D) Porcentaje de células CD4+ CD62L+ CCR7+ viables.

(E) Porcentaje de células CD8+ CD69+ viables.

60

(F) Porcentaje de células CD4+ CD69+ viables.

(G) Porcentaje de células CD8+ PD1+ viables.

5

En los experimentos A a G, todos los valores se determinaron mediante citometría de flujo y son representativos de al menos dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Las barras representan la DE. Todas las pruebas eran de dos caras.

10 **Figura 12: Eficacia terapéutica de células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM *in vivo* en el modelo tumoral EG7-PD-L1**

14 ratones se inyectaron por vía subcutánea con células EG7-PD-L1. Una vez que se establecieron los tumores, 6, 3 y 5 ratones se asignaron al azar a ningún tratamiento (PBS), a la transferencia adoptiva de células T OT-1 no transducidas y a la transferencia adoptiva de células T OT-1 transducidas con proteína PTM, respectivamente. Las figuras son representativas de 3 experimentos independientes con 3 a 6 ratones por grupo. El tamaño del tumor se midió de forma ciega cada 2 a 3 días, (A). Curvas de supervivencia del experimento de la Figura 12A, (B). Los ratones supervivientes (n = 2) se volvieron a exponer a células EG7-PD-L1 al mismo tiempo que los ratones de tipo salvaje sin tumor (n = 2), (C).

20

El análisis de supervivencia se realizó utilizando la prueba de rango logarítmico. A modo de comparación, se utilizó ANOVA bidireccional de crecimiento tumoral con corrección para pruebas múltiples. Todas las pruebas eran de dos caras.

25 **Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.**

De manera ilustrativa, en los siguientes Ejemplos 1 a 3 y 5, la proteína de fusión se construyó con las secuencias murinas del polipéptido PD-1 y el polipéptido CD28. El Ejemplo 4 se refiere al análisis funcional de una proteína de fusión PD-1-CD28 humana (SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico (ADNc)); 24 (proteína)) que comprende un polipéptido PD-1 que está unido/fusionado operativamente a través de su extremo C al extremo N de un dominio intracelular de un polipéptido CD28 humano (SEQ ID NO: 21 (ácido nucleico (ADNc)); 22 (proteína)), donde el polipéptido PD-1 comprende el dominio extracelular de PD-1 (SEQ ID NO: 17 (ADNc), 18 (proteína)) y el dominio transmembrana de PD-1 (SEQ ID NO: 19 (ADNc), 20 (proteína)) como se representa en la SEQ ID NO: 15 (ácido nucleico) y 16 (proteína). La proteína de fusión PD-1-CD28 como se prepara en el Ejemplo 4 tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 24 (codificada por un ADNc mostrado en SEQ ID NO: 23).

Ejemplo 1: Generación de las proteínas de fusión PD-1-CD28

Ejemplo 1.1 Las proteínas de fusión PD-1-CD28 murinas PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)) y 14 (proteína), CTM (SEQ ID NO: 43 (ácido nucleico (ADNc)) y 44 (proteína)), CEX (SEQ ID NO: 49 (ácido nucleico (ADNc)) y 50 (proteína)), PTM-FMNM (SEQ ID NO: 51 (ácido nucleico (ADNc)) y 52 (proteína)), PTM-AYAA (SEQ ID NO: 53 (ácido nucleico (ADNc)); 54 (proteína)) y PTM-FMNM-AYAA (SEQ ID NO: 55 (ácido nucleico (ADNc)); 56 (proteína))

Las proteínas de fusión PD-1-CD28 se generaron mediante PCR de extensión de superposición y clonación de expresión recombinante en el vector retroviral pMP71 (Schambach y col., Mol Ther 2(5) (2000), 435-45; EP-B1 0 955 374). La amplificación se realizó en tres etapas: primero, se amplificó el dominio extracelular y transmembrana de PD-1 con una superposición parcial para el dominio intracelular de CD28 (5-ATAGCGGCCG CGCCACCATG TGGGTCCGG-3' (SEQ ID NO: 59); 5'- CCTTCTACTA TTGCAGAAGA CAG-3' (SEQ ID NO: 60)). Al mismo tiempo, se amplificó CD28 intracelular con una superposición parcial para el dominio transmembrana PD-1- (5'- CTGTCTTCTG CAATAGTAGA AGG-3' (SEQ ID NO: 61); 5-TATGAATTCT CAGGGGCGGT ACGCTGCA-3' (SEQ ID NO: 62)). En la tercera etapa de reacción, ambos productos se utilizaron como plantillas de amplificación utilizando el cebador 5'- PD-1 (5-ATAGCGGCCG CGCCACCATG TGGGTCCGG-3' (SEQ ID NO: 63) y el cebador 3-CD28 (5'- TATGAATTCT CAGGGGCGGT ACGCTGCA-3' (SEQ ID NO: 64)). Después de la amplificación, el inserto se ligó en el vector pMP71 usando corte con enzima de restricción *EcoRI* y *NotI* y ligación de ADN.

La proteína de fusión transmembrana PD-1- murina resultante (PTM; SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)) y 14 (proteína)) consiste en PD-1 murina (mPD-1) (Entrada Uniprot Q02242 (número de acceso con número de versión: 125 y versión 1 de la secuencia) aminoácidos (AA) 1-190; SEQ ID NO: 5 (ácido nucleico (ADNc)) y 6 (proteína)) y CD28 murina (mCD28) (Entrada Uniprot No.: P31041 (número de acceso con número de versión: 127 y versión 2 de

la secuencia) AA 178-218; SEQ ID NO: 11 (ácido nucleico (ADNc)) y 12 (proteína)).

La proteína de fusión transmembrana CD28 murina resultante (CTM (SEQ ID NO: 43 (ácido nucleico (ADNc)) y 44 (proteína)) consiste en PD-1 murina (AA 1-169; SEQ ID NO: 39 (ácido nucleico (ADNc)) y SEQ ID NO: 40 (proteína)) y CD28 murina (AA 151-218 (SEQ ID NO: 41 (ácido nucleico (ADNc)) y 42 (proteína)).

La proteína de fusión extra y transmembrana de CD28 murina resultante (CEX (SEQ ID NO: 49 (ácido nucleico (ADNc)) y SEQ ID NO: 50 (proteína)) consiste en PD-1 murina (AA 1-169 (SEQ ID NO: 45 (ácido nucleico (ADNc)) y SEQ ID NO: 46 (proteína)) y CD28 murina (AA 115-218 (SEQ ID NO: 47 (ácido nucleico (ADNc)) y SEQ ID NO: 48 (proteína)).

10

Las variantes de PTM murina se generaron a partir del receptor de fusión de PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) mediante mutaciones puntuales de la siguiente manera: mutación de YNMN (AA 189-192; SEQ ID NO: 29) a FMNM (SEQ ID NO: 31) dando como resultado el constructo PTM-FMNM (SEQ ID NO: 51 (ácido nucleico (ADNc)); 52 (proteína)); mutación de PYAP (AA 206-209; SEQ ID NO: 30) a AYAA (SEQ ID NO: 32) dando como resultado el constructo PTM-AYAA (SEQ ID NO: 53 (ácido nucleico (ADNc)); 54 (proteína)); y el mutante doble PTM-FMNM-AYAA (SEQ ID NO: 55 (ácido nucleico (ADNc)); 56 (proteína)). Las variantes de la proteína de fusión de PTM murina se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando la construcción de tipo salvaje utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Gene Art (Life Technologies) para intercambiar uno (YNMN (SEQ ID NO: 29) a FMNM (SEQ ID NO: 31)) o dos (PYAP (SEQ ID NO: 30) a AYAA (SEQ ID NO: 32)) pares de bases.

20

Ejemplo 1.2 Mutante de eliminación de PD-1 (SEQ ID NO: 57 (ácido nucleico (ADNc)) y 58 (proteína))

El mutante de eliminación de PD-1 ha sido descrito previamente por Okazaki T y col., Proc Natl Acad Sci USA 98(24) (2001), 13866-13871. El mutante de eliminación de PD-1 contiene las secuencias como se representa en SEQ ID NO: 57 (ácido nucleico (ADNc)) y 58 (proteína).

25

Ejemplo 2: Transducción de células T y ensayos de destrucción citotóxica

2.1 Líneas celulares

30

La línea celular de cáncer pancreático murino Panc02 y su contraparte transfectada con ovoalbúmina Panc02-OVA se han descrito previamente (Jacobs y col., Int J Cancer 128(4) (2011), 897- 907). La línea celular Panc02 se generó a través de la inyección del carcinógeno Methycholantren A en el páncreas de ratones C57B1/6 de tipo salvaje para inducir carcinogénesis. Panc02-OVA-PD-L1 y Panc02-PD-LI se generaron por transducción con pMXs-puro (Kitamura y col., Exp. Hematol. 31 (2003), 1007-1014) que contiene PD-L1 murino de longitud completa (SEQ ID NO: 29 (ácido nucleico (ADNc)) y 30 (proteína)) y selección con puromicina con una concentración final de 10 µg/ml. La línea celular de empaquetamiento Plat-E ha sido descrita previamente por Morita y col., Gene Ther 7 (2000), 1063-6). Todas las células se cultivaron en DMEM con 10% de suero bovino fetal (FBS, Life Technologies, EE. UU.), 1% de penicilina y estreptomycin (PS) y 1% de L-glutamina (todos de PAA, Alemania). Se añadieron 10 µg/ml de puromicina y 1 µg/ml de blasticidina (Sigma, Alemania) al medio Plat-E (Platinum-E). Se cultivaron células T murinas primarias (véase la sección 2.5 a continuación para el cultivo) en RPMI 1640 con FBS al 10%, PS al 1% y L-glutamina al 1%, piruvato de sodio al 1%, HEPES 1 mM y β-mercaptoetanol 50 µM al medio de células T.

35

40

2.2 Animales

45

Los ratones transgénicos para un receptor de células T específico para ovoalbúmina (OT-1) se obtuvieron del laboratorio de Jackson, EE. UU. (número de stock 003831) y se criaron en nuestras instalaciones para animales en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Los ratones OT-1 se cruzaron con ratones marcadores congénicos CD45.1 (obtenidos del laboratorio Jackson, número de stock 002014) y con ratones marcadores congénicos CD90.1 (número de stock: 000406) para generar ratones CD45.1-OT-I y CD90.1-OT-I, respectivamente. Los ratones C57B1/6 de tipo salvaje se adquirieron en Janvier, Francia. Los tumores se indujeron mediante inyección subcutánea de 2 x 10⁶ células tumorales y los ratones se trataron mediante inyección i.v. de células T como se indica. Para los experimentos de reexposición, a los ratones se les inyectaron por vía subcutánea 0,5 x 10⁶ células en el flanco opuesto al sitio del tumor previamente rechazado. Todos los experimentos fueron aleatorizados y cegados. Para los experimentos de neutralización, se aplicó el anticuerpo anti-IFN-γ R4-6A2 (BioXcell, EUA) o el control de isotipo (BioXcell, EUA) i.p. a una dosis de 200 µg por animal cada tres días durante cuatro dosis. El crecimiento tumoral y la condición de los ratones se controlaron cada dos días.

50

60

2.4 Transducción de células T

El vector retroviral pMP71 (Schambach y col., Mol Ther 2(5) (2000), 435-45; EP- B1 0 955 374) para la transfección de la línea celular de empaquetamiento ecotrófico Plat-E (Platinum-E). La transducción se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Leisegang y col., J Mol Med 86 (2008), 573-83; Mueller y col., J Virol. 86 (2012), 10866-10869; Kobold y col., J Natl Cancer Inst (2014), en prensa. En resumen, la línea celular de empaquetamiento Plat E (como se describe en Morita y col., Gene Ther 7 (2000), 1063-6) se sembró en placas de 6 pocillos y se cultivó durante la noche hasta 70 - 80% de confluencia. El primer día, se mezclaron 16 µg de ADN junto con CaCl₂ 100 mM (Merck, Alemania) y cloroquina 126,7 µM (Sigma, EE. UU.). Las células Plat-E se privaron de alimento durante 30 min en medio con bajo contenido de suero (3%) y a continuación se incubaron durante 6 h con el ADN precipitado. A continuación, se retiró el medio y se intercambió con medio de cultivo. En el día dos, se recolectaron esplenocitos primarios de ratones C57B1/6 (Harlan Laboratories, Países Bajos). Las suspensiones de células individuales de esplenocitos se estimularon con anti-CD3 (clon 145-2cll BD Pharmingen, EE. UU.), anti-CD28 (clon 37.51, BD Pharmingen, EE. UU.) e IL-2 murina recombinante (Peprotech, Alemania) en medio de células T durante la noche. El día 3, se recubrieron placas de 24 pocillos con 12,5 µg/ml de retronectina recombinante (Takara Biotech, Japón) durante 2 h a temperatura ambiente, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% (Roth, Alemania) durante 30 min a 37 °C y se lavaron con PBS. El sobrenadante de la Placa E se recogió y se pasó a través de un filtro (40 µm, Milipore, EE. UU.). A continuación, se añadió medio de células T fresco a las células Plat E. Se distribuyó 1 ml de sobrenadante filtrado en cada pocillo y se espinoculó durante 2 h a 4 °C. A continuación, el sobrenadante se retiró de la placa de 24 pocillos. 10⁶ células T se sembraron en un ml de medio de células T complementado con 10 U de IL-2 y 400000 perlas anti-CD3 y anti-CD28 (Invitrogen, Alemania) por pocillo y se espinocularon a 800 g durante 30 minutos a 32 °C. El día cuatro, el sobrenadante de la Placa E se recogió de nuevo y se filtró. Se añadió 1 ml a cada pocillo de la placa de 24 pocillos y se espinoculó a 800 g durante 10 min a 32 °C. Las células se incubaron posteriormente durante 6 horas adicionales a 37 °C. 1 ml de sobrenadante se reemplazó por medio de células T con IL-2. En el día cinco, las células se recogieron, se contaron y se volvieron a sembrar a una densidad de 10⁶ células/ml en medio de células T complementado con 10 ng de IL-15 por ml (Peprotech, Alemania). Las células T se mantuvieron a esta densidad hasta el día 10, cuando se realizaron análisis celulares o ensayos funcionales.

2.5 Co-cultivo de células T y células tumorales

Células T y células tumorales se cocultivaron durante 48 h en una proporción de 10:1 en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueante anti-PD-1 (10 µg/ml, clon RPM1-14, Biolegend) o anticuerpo SIINFEKL H2kb anti-ratón (20 µg/ml, clon 25.D1-16, Miltenyi Biotech, Alemania). Los sobrenadantes se analizaron para IFN-γ mediante ELISA (BD).

Ejemplo 3: Ensayos de liberación de citocinas, proliferación y destrucción de células T

3.1 Ensayos de células T funcionales

Las células T se estimularon con anticuerpo anti-CD3e (100 ng/ml, clon 145-201, eBioscience), anticuerpo anti-CD28 (2 µg/ml, clon 37.51, eBioscience) o quimera Fc PD-L1 recombinante (5 µg/ml, R&D Systems) o la combinación de estos durante 48 h. Las citocinas se cuantificaron en sobrenadantes mediante ELISA (IL-2 e IFN-γ, ambos BD; número de catálogo: DY402 y DY485, respectivamente) o se detectaron cualitativamente mediante inmunotransferencia (matriz de citocinas murinas de I + D; número de catálogo: ARY006). Para los ensayos de proliferación, las células se estimularon como se describió anteriormente durante 24 h antes de la tinción como se describió. Las células se contaron mediante la adición de perlas de recuento (Life Technologies, Alemania; número de catálogo: C36950) y el análisis posterior mediante citometría de flujo. Para los ensayos de destrucción, se estimularon 300.000 células T transformadas con las proteínas de fusión durante 40 h con anticuerpo anti-CD3e y PD-L1 recombinante (R&D, número de catálogo: 1019-B7-100), como se indicó anteriormente. Entretanto, las células tumorales Panc-OVA se sembraron a una densidad de 15.000 por pocillo de una placa de 8 pocillos y se cultivaron durante la noche. Después de 16 h, las células T estimuladas se añadieron a los pocillos que contenían células tumorales y el número de células se monitoreó continuamente mediante medición de impedancia utilizando un instrumento ICELLigence (ACEA Bioscience, EE. UU.).

3.2 Estimulación de células T humanas

Las PBMC CD3⁺ humanas se transdujeron retroviralmente con proteína de fusión de PTM humana (hPTM) (SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico (ADNc)) y 24 (proteína)), y se expandieron durante 4 días usando IL-2 (Peprotech) e IL-15 (Peprotech). La estimulación de células T se determinó realizando un ensayo de estimulación. Por lo tanto, las placas de 96 pocillos de fondo plano se recubrieron con PBS que contenía 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 humano (clon: HIT3a; eBioscience) o 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 humano y 5 µg/ml de quimera Fc B7-H1 humana recombinante (R&D) o 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 humano y 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD28 humano (clon: cd28.2; eBioscience) durante la noche a 4 °C. Se situaron 3,0 x 10⁵ células transducidas por pocillo en la placa de 96 pocillos

recubierta. Después de 48 h de incubación a 37 °C, se recogieron sobrenadantes celulares de CO2 al 5 %. La liberación de IFN- γ humano se cuantificó utilizando el IFN- γ -ELISA humano (BD Bioscience) de acuerdo con las directrices del fabricante.

5 3.3 Reestimulación de esplenocitos

Se incubaron esplenocitos de ratones después del rechazo tumoral o de ratones de control durante 4 h (ICS), 1 μ g/ml de los péptidos SIINFEKL (SEQ ID NO: 65), TRP2 o P15E (todos de JPT Peptides, Alemania) antes del análisis por citometría de flujo. La normalización de fondo se realizó calculando la relación de estimulación con el péptido activo frente al control TRP2: calculado con la fórmula: % células CD8+ IFN γ + de la condición objetivo/ %CD8+ IFN γ + de la condición TRP2.

3.4 Citometría de flujo

La citometría de flujo multicolor en un BD FACS Canto II (BD bioscience, Alemania) utilizó los siguientes paneles de anticuerpos: para el análisis de células T OT-1 transferidas adoptivamente, anti-PD-1 (PE-Cy7, clon 29F.1A12) y anti-CD8 (APC, clon 53.6-7, ambos de Biolegend, EE. UU.); para el análisis p- Akt, CD8a anti-ratón (Pacific Blue, clon 53-6.7) y PD-1 anti-ratón (PeCy7, clon 29F.1A12, ambos de Biolegend, EE. UU.), posterior fijación y permeabilización utilizando un conjunto de tampones de tinción de factor de transcripción/Foxp3 (eBioscience, EE. UU.) y tinción con anti Akt (pS473) (AlexaFluor 647, clon M89-61, eBioscience). Para el análisis de ki67 y proliferación, las células se tiñeron con colorante de viabilidad fijable (eFluorTM 780, eBioscience), CD8a anti-ratón y PD-1 anti-ratón (clon de APC 29F.1A12, Biolegend) y posteriormente se fijaron y permeabilizaron. Después de la tinción intracelular con anti-Ki67 (PE, clon 16A8, Biolegend), las células se lavaron y se resuspendieron en PBS que contenía Count Bright Absolute Counting Beads (Life Technologies). Para los experimentos de seguimiento, las células se tiñeron con CD8a anti-ratón (APC-Cy7, clon 53-6.7, Biolegend), CD45.1 anti-ratón (APC, clon A20, eBioscience) o CD90.1 anti-ratón (PeCy7 o Pacific BlueTM, clon 0X7 de Biolegend). Para los experimentos de co-seguimiento, se calculó la relación entre las células CD45.1 y CD90.1. Las células se fijaron/permeabilizaron y se tiñeron intracelularmente con anticuerpo IFN- γ anti-ratón (FITC, clon XMG1.2, Biolegend). Para la reestimulación *in vitro*, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD3e-APC (clon 145-201, Biolegend), anti-CD8-PerCP (clon 53-6.7, Biolegend) y anti-IFN- γ - FITC (clon XMG1.2, Biolegend). Para la capacidad de unión a PD-L1, las células se incubaron con 5 μ g/ml de PD-L1-Fc recombinante (R & D) y se tiñeron con anticuerpo anti-IgG humana-APC (clon HP6017, Biolegend). Para el análisis de la expresión de PD-L1, las células tumorales se estimularon con IFN- γ recombinante como se indica (Peprotech, Alemania) durante 48 h. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-PD-L1-APC (clon 10F.9G2, Biolegend). La tinción de células supresoras derivadas de mieloides se realizó usando anticuerpos anti-CD45 (PacBlue, clon 30F11, Biolegend), anti-CD11b (Percp-Cy5.5, clon MI/70, Biolegend), anti-Ly6 (APC-Cy7, HK1.4, Biolegend) y anti-Grl (FITC, clon RB6-8C5, Biolegend). Las células T reguladoras se detectaron mediante anticuerpos anti-CD4 (APC-Cy7, clon GK1.5, Biolegend), anti-CD8 (Percp, 53-6.7, Biolegend) y tinción intracelular para Foxp3 (eFluor450, clon FJK-16s, eBioscience).

40 3.5 Análisis estadístico

Para las estadísticas, se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.0b. Todas las variables informadas son continuas. Las diferencias entre las condiciones experimentales se analizaron utilizando la prueba t de Student bilateral no emparejada. Para la comparación de las condiciones experimentales de ratones individuales, se utilizó la prueba de Mann-Whitney, los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Para los experimentos *in vivo*, las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando ANOVA bidireccional con corrección para pruebas múltiples mediante el procedimiento de Bonferroni.

La supervivencia general se analizó mediante una prueba de rango logarítmico. La supervivencia se define en días desde la inducción del tumor hasta la muerte natural o hasta que los ratones fueron sacrificados porque se alcanzó uno de los siguientes criterios predefinidos: tamaño del tumor $> 225 \text{ mm}^2$, pérdida de peso $> 15\%$ o angustia grave. Los datos se muestran como valores medios $\pm$ SEM de un mínimo de tres réplicas biológicas o experimentos independientes, como se indica.

55 3.6 Resultados:

3.6.1 Justificación y diseño de un nuevo receptor de fusión PD-1-CD28

Se evaluó la eficacia de la transferencia adoptiva de células T CD8+ específicas de OVA en ratones con tumores Panc02 (Panc02-OVA) que expresan OVA establecidos. Las células T transferidas no pudieron rechazar los tumores

en la mayoría de los animales. Esto fue paralelo a la regulación positiva de PD-1 en las células T transferidas que se infiltraron en el tumor (Figura 5A y 5B). Dado que las células Panc02-OVA expresan el ligando para PD-1 (PD-L1), que está regulado por IFN- γ (Figura 5C y 5D), esto apunta a un papel relevante del eje PD-1-PD-L1 en la supresión de la respuesta de células T específicos de antígeno en el tumor. Sin limitarse a la teoría, se asumió que la protección de las células T transferidas de la supresión mediada por PD-1 puede mejorar la eficacia de la terapia adoptiva de células T. Debido a que PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA-4, parecía posible que la señalización del receptor pudiera ser compatible y que una construcción de receptor PD-1-CD28 de fusión pudiera convertir el acoplamiento de PD-1 por PD-L1 en actividad coestimuladora de CD28 (esquema en la Figura 5E). Por lo tanto, se diseñaron receptores de fusión que consisten en la porción extra y transmembrana de PD-1 con el dominio intracelular de CD28 para la transducción en células T murinas primarias.

3.6.2 Análisis funcional de células T transducidas *in vitro*

Para probar la funcionalidad de la proteína de fusión PD-1-transmembrana PD-1-CD28 murina (PTM, SEQ ID NO: 13 (ADNc) y 14 (proteína)), se transdujeron células T murinas primarias y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 agonistas y PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 29 y 30). Las células T transducidas con PTM mostraron un marcado aumento de IFN- γ (170 $\pm$ 26 frente a 0,5 $\pm$ 0,5 ng / ml, p = 0,003, Figura 1A) e inducción de IL-2 en comparación con las células T no transducidas (Figura 6F). La estimulación adicional con anticuerpo anti-CD28 impulsó aún más la producción de citocinas (Figura 7A). La inducción de citocinas fue paralela a la fosforilación aguas abajo de AKT tras el acoplamiento de PD-L1 (Figura 1B), lo que demuestra la señalización de CD28 en células T transducidas. La activación del receptor de PTM mejoró de forma estadísticamente significativa el número de células viables en comparación con las células T no transducidas (42 $\pm$ 4 frente a 6 $\pm$ 1 células por perla, p =0,001, Figura 1C). Este aumento en el número de células se asoció con una fuerte regulación positiva de ki67 por las células T transducidas (Figura 1D), lo que indica una fuerte actividad mitótica. Al cocultivar células T OT-1 transducidas con PTM con células Panc02-OVA o Panc02, se observó una fuerte actividad coestimuladora, como lo demuestra la liberación de IFN- γ en células T transducidas en comparación con células T no transducidas (545 $\pm$ 37 frente a 191 $\pm$ 0,5 ng / ml, p <0,001, Figura 1E). La actividad coestimuladora de la proteína de fusión PTM murina dependió de la presencia de PD-L1, de la expresión de OVA por las células tumorales y del acoplamiento de TCR, como se evidencia por el bloqueo de MHC-I (Figura 1E) y por el cocultivo con células Panc02-PD-L1 negativas para OVA (Figura 7B). Las células T transducidas con el receptor PTM preestimulado con anticuerpo anti-CD3 y PD-L1 mediaron la lisis inmediata y completa de las células tumorales, mientras que las células T no transducidas fueron ineficaces (p <0,001 a partir de las 22 h, Figura 1F). Juntos, estos hallazgos indican que las células T transducidas con la proteína de fusión PTM murina se han vuelto resistentes a la anergia mediada por PD-1-PD-L1. Estos resultados demuestran la funcionalidad y el potencial terapéutico del receptor de la proteína de fusión PD-1-CD28 murina (PTM, SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) *in vitro*.

3.6.3 Comparación funcional de diferentes construcciones de fusión PD-1-CD28

Se han descrito dos proteínas de fusión PD-1-CD28 con una inducción de citocinas de hasta dos veces, poca actividad proliferativa y cierto potencial citolítico (Ankri y col., J. Immunol 191(8) (2013), 4121-4129 y Prosser y col., Mol. Immunol. 51(3-4) (2012), 263-272). Dados los fuertes efectos observados con la proteína de fusión PTM murina, se analizó si la diferencia con nuestros resultados está relacionada con la estructura de la proteína de fusión PD-1-CD28 (PTM). Por lo tanto, se generaron proteínas de fusión adicionales para las construcciones del receptor de fusión PD-1-CD28 que contenían el dominio transmembrana CD28 (murino) (CTM, SEQ ID NO: 43 (ácido nucleico (ADNc)); 44 (proteína)) o el dominio transmembrana CD28 más parte del dominio extracelular CD28 (CEX, SEQ ID NO: 49 (ácido nucleico (ADNc)); 50 (proteína)); véase la Figura 2A. Cuando se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y PD-L1 recombinante, todos los receptores fueron funcionales según lo evaluado por la liberación de IFN- γ (79 $\pm$ 0,9 frente a 4 $\pm$ 1 frente a 7 $\pm$ 2 ng / ml, p < 0,001, Figura 2B) y por la inducción de la proliferación (540 $\pm$ 45 frente a 278 $\pm$ 37 frente a 279 $\pm$ 46 células por perla, p = 0,01 y 0,02, respectivamente, Figura 2C). Sin embargo, la proteína de fusión PTM fue muy superior a los receptores CTM y CEX en términos de secreción y proliferación de IFN- γ . Mecánicamente, la actividad mejorada fue paralela a la unión mejorada de PD-L1 a la proteína de fusión PTM en oposición a la proteína de fusión CTM y CEX (MFI 9315 $\pm$ 165 frente a 2311 $\pm$ 144 frente a 2997 $\pm$ 167, p < 0,001, Figura 2D). La unión mejorada de la proteína de fusión PTM solo puede explicarse en parte por el aumento de la expresión superficial de esta construcción, ya que la expresión en células CD8-T por citometría de flujo no fue en gran medida superior para todas las proteínas de fusión (Figura 2E). La unión mejorada de la proteína de fusión PTM puede ser responsable de su actividad funcional notablemente superior en comparación con las otras proteínas de fusión CEX y CTM.

3.6.4 Dominios funcionales requeridos para la función de la proteína de fusión PTM

Para diseccionar aún más los mecanismos subyacentes a la actividad de PTM, generamos proteínas de fusión mutantes PD-1-CD28 PTM donde los dominios de señalización de CD28 se hicieron no funcionales. El motivo YNMN del dominio CD28 intracelular es necesario para la secreción óptima de citocinas tras la activación de CD28 y el motivo PYAP es esencial tanto para la producción de citocinas como para la actividad proliferativa celular (Boomer y Green, Cold Spring Harb Perspect Biol 8 (2010), a002436). Generamos una construcción mutante PTM-FMNM (SEQ ID NO: 51 (ácido nucleico (ADNc)); 52 (proteína)), una construcción mutante aPTM-AYAA (SEQ ID NO: 53 (ácido nucleico (ADNc)); 54 (proteína)) y una construcción mutante doble PTM-FMNM-AYAA (SEQ ID NO: 55 (ácido nucleico (ADNc)); 56 (proteína)) para la expresión en células T murinas primarias (Figura 3A). Las células T que expresan la construcción de PTM o una de las tres construcciones mutantes se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y PD-L1 recombinante. Las células T transducidas con la construcción de fusión PTM produjeron de manera estadísticamente significativa más IFN- γ que PTM-FMNM, PTM-AYAA o PTM-FMNM-AYAA (22 $\pm$ 2 frente a 8 $\pm$ 1 frente a 1 $\pm$ 0,07 frente a 0,1 $\pm$ 0,05 ng / ml, $p < 0,001$, Figura 3B). El compromiso de la construcción de fusión PTM indujo la proliferación de una manera dependiente de PYAP, mientras que YNMN fue prescindible para el efecto proliferativo (Figura 3C). Por el contrario, la producción de varias citocinas y quimiocinas mediante el compromiso de la construcción de fusión de PTM parece depender de ambos motivos, ya que las construcciones mutantes fueron inductores más débiles en comparación con la proteína de fusión de PTM nativa (Figura 3D).

3.6.5 Eficacia terapéutica de células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PD-1-CD28 en un modelo de cáncer pancreático murino

Para evaluar adicionalmente la potencia de las células T específicas para el antígeno transducidas con la proteína de fusión PD-1-CD28 murina (PTM; SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)), se trataron ratones con tumores Panc02-OVA subcutáneos con células T OT-1 no transducidas o células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM. Las células T transducidas con el receptor de PTM indujeron una inmunidad antitumoral superior en comparación con los ratones que recibieron células T no transducidas (Figura 4A). Curiosamente, las células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM conservaron su potencial terapéutico en el modelo Panc02-OVA-PD-L1 que sobreexpresaba fuertemente PD-L1, mientras que el efecto de las células OT-1 no transducidas se anuló casi por completo (Figura 7C). Cuando se volvieron a exponer a las células Panc02-OVA, 11 de los 12 ratones tratados previamente con células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM permanecieron libres de tumores en comparación con el 0 % de los ratones de control ($p < 0,001$, Figura 4B). Además, cuando se volvieron a desafiar con células Panc02 de tipo salvaje, 9 de 11 ratones tratados previamente con células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM permanecieron libres de tumor ($p < 0,001$, Figura 4C). Estos resultados sugieren la propagación del epítipo en ratones curados que conduce a la inmunidad contra otros antígenos asociados a tumores específicos de Panc02, tales como p15E (Bauer y col., Gut 56(9) (2007), 1275-1282). Por lo tanto, se analizaron los ganglios linfáticos de ratones sin tumor para detectar la presencia de SIINFEKL (OVA; SEQ ID NO: 65)) y de células T CD8⁺ específicos de p15E (gp70). Se encontró un aumento estadísticamente significativo en el número de células CTL específicas de SIINFEKL en ratones después de la transferencia de células T transducidas en comparación con CTL específicos para el péptido de control (13 $\pm$ 3 frente a 1 $\pm$ 0, $p = 0,008$, Figura 4D). También detectamos un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo de CTL específicos de p15E- (3 $\pm$ 1 frente a 1 $\pm$ 0, $p = 0,008$, Figura 4D). La inmunidad resultante fue transferible como se muestra por la protección tumoral en 3 de 9 ratones transferidos adoptivamente con esplenocitos de ratones curados y el retraso en el crecimiento del tumor, en comparación con ninguno de 3 ratones transferidos con esplenocitos vírgenes (Figura 4E).

3.6.6 Distribución de células T transferidas de forma adoptiva en ratones con tumores

Para diferenciar si la eficacia terapéutica de las células T OT-1 transducidas con proteína de fusión de PTM frente a las no transducidas se debe a la presencia del dominio CD28 en la proteína de fusión de PTM o simplemente a la expresión de una PD-1 sin señalización en la superficie de la célula T, expresamos un mutante de delección de PD-1, desprovisto de la porción intracelular de PD-1 (PD-1del, SEQ ID NO: 57 (ácido nucleico (ADNc)); 58 (proteína)). La inyección de células T OT-1 transducidas con PD-1 del no mejoró la eficacia terapéutica en comparación con las células T OT-1 no transducidas en el modelo Panc02-OVA, en contraste con la inyección de células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM (Figura 5A). Estos resultados indicaron dependencia del dominio CD28 intracelular de la proteína de fusión PTM. A continuación, investigamos el destino de la proteína de fusión PTM (SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) transducida frente a células T OT-1 no transducidas en ratones portadores de tumores. Las células T transducidas con proteína de fusión PTM mostraron enriquecimiento en tumores Panc02-OVA en comparación con células T no transducidas (59 $\pm$ 2 frente a 49 $\pm$ 1 %, $p = 0,002$). Este efecto no se observó en los ganglios linfáticos ni en los órganos de ratones no portadores de tumores (Figura 5B). Además, las células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM produjeron de forma estadísticamente significativa más IFN- γ que las células T OT-1 no transducidas en el tumor en comparación con otros órganos o con ratones no portadores de tumor (1,5 $\pm$ 0,2 frente a 0,6 $\pm$ 0,02 frente a 0,9 $\pm$ 0,03 de proporción de PTM IFN- γ + con respecto

a células T IFN- γ + no transducidas, $p=0,002$, Figura 5C). La neutralización de IFN- γ *in vivo* anuló casi por completo el impacto terapéutico de las células T OT-1 transducidas con PTM, lo que indica la importancia de esta citocina para la función del receptor (Figura 7D). Para diseccionar adicionalmente los motivos de señalización responsables de la acumulación de células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM en el tumor, se utilizaron las células T PTM-FMNM (SEQ ID NO: 51 (ácido nucleico (ADNc)); 52 (proteína)), PTM-AYAA (SEQ ID NO: 53 (ácido nucleico (ADNc)); 54 (proteína)) y PTM-FMNM-AYAA (SEQ ID NO: 55 (ácido nucleico (ADNc)); 56 (proteína)) transducidas con la construcción mutante descritos anteriormente para comparar su destino con los células T OT-1 transducidas con la proteína de fusión PTM en animales portadores de tumores. La infiltración de células T y la persistencia de células T transducidas con proteína de fusión PTM en el sitio del tumor parecen depender de los motivos YMMN (SEQ ID NO: 29) y PYAP (SEQ ID NO: 30), ya que las células T que portaban los mutantes se encontraron en cantidades menores en comparación con las células T que portaban el receptor de tipo salvaje (Figura 5D). El aumento en las células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM de infiltración cambió la relación de células T CD8⁺ de infiltración a células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) a favor de las células T OT-1 transducidas con proteína de fusión PTM (0,7 +/- 0,1 vs. 0,1 +/- 0,03, $p < 0,001$, relación de células T PTM-CD8 + a MDSC, Figura 5E). Se observó un efecto similar para la relación de células T CD8⁺ a células T reguladores (Figura 7E). Juntos, estos hallazgos indican que la transferencia adoptiva de células T transducidas con proteína de fusión PTM inclinó la balanza de la inmunosupresión hacia la inmunidad productiva.

Ejemplo 4: Generación de un receptor PD-1-CD28 con secuencia humana (SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico (ADNc)) y 24 (proteína))

De acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.1 anterior, se generó la proteína de fusión PD-1-CD28 homóloga humana y se clonó en el vector pMP71 después de la digestión y ligación con *NotI* y *EcoRI*. La proteína de fusión transmembrana PD-1- humana resultante (hPTM (SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico (ADNc)) y 24 (proteína)) consiste en la PD-1 extracelular (Entrada Uniprot No.: Q15116 (número de acceso con el número de versión de entrada 138 y la versión 3 de la secuencia), AA 1-170; SEQ ID NO: 17 (ácido nucleico (ADNc)) y 18 (proteína)), la secuencia transmembrana PD-1 humana (Entrada Uniprot No.: Q15116 (número de acceso con el número de versión de entrada 138 y la versión 3 de la secuencia), AA 171-191, SEQ ID NO: 19 (ácido nucleico) y 20 (proteína)) y la región intracelular de CD28 humano (Entrada Uniprot No.: P10747 (número de acceso con la versión de entrada: 164 y versión 1 de la secuencia), AA 180-220, SEQ ID NO: 21 (ácido nucleico (ADNc)) y 22 (proteína)).

4.1 Funcionalidad de la proteína de fusión PD-1-CD28 humana (SEQ ID NO: 23 (ácido nucleico (ADNc)) y 24 (proteína)) en células T humanas

Las células T humanas primarias se transdujeron con la proteína de fusión PD-1-CD28 humana (hPTM, SEQ ID NO: 23 (ADNc) y 24 (proteína)) y se estimularon con anticuerpo anti-CD3, solo o en combinación con anticuerpo anti-CD28 o con PD-L1 recombinante (R&D, N.º de catálogo: 156-B7-100). La estimulación simultánea de células T con anticuerpo anti-CD3 y PD-L1 conduce a una inducción significativamente mayor de IFN- γ en células T transducidas, pero no en células T no transducidas, en comparación con células estimuladas con anticuerpo anti-CD3. Esto demuestra la funcionalidad y la ventaja de estimulación de las células T transducidas con la proteína de fusión PD-1-CD28 humana.

Ejemplo 5: Transducción de células T y ensayos de destrucción citotóxica

Los experimentos seleccionados del Ejemplo 3 se repitieron usando una población de células T CD4⁺ clasificada y/o la línea de células tumorales, EG7-PD-L1. Los materiales y procedimientos para estos experimentos fueron idénticos a los descritos en los Ejemplos 2 y 3 con las excepciones indicadas a continuación.

5.1 Líneas celulares

La línea celular de cáncer de páncreas murino Panc02 y su contraparte transfectada con ovoalbúmina Panc02-OVA fueron como se describe en la sección 2.1, anteriormente.

La línea celular tumoral EG7-PD-L1 se basó en la línea celular EL4. La línea celular tumoral EL4 se creó mediante inducción de linfoma en un ratón C57BL por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno. La transfección basada en electroporación con el plásmido pAc-neo-OVA, que lleva una copia de ARNm de ovoalbúmina de pollo (OVA) y un gen de resistencia a neomicina (G418), conduce al establecimiento del derivado de EL4 E.G7-OVA (Moore MW y col., Cell 54; 777-785, 1988). Luego se generó EG7-OVA-PDL1 mediante transducción retroviral con pMX-s (Kitamura y col., Exp. Hematol. 31 (2003), 1007-1014) que contiene las SEQ ID NO: 29 (ácido nucleico (ADNc)) y 30 (proteína) de PD-L1 murino de longitud completa y por clasificación celular posterior basada en FACS para células positivas para PD-L1 (anti-PD-L1,

APC, clon 10F.9G2, BioLegend). Las células tumorales EG7-PD-L1 se cultivaron en RPMI 1640 con FBS al 10%, PS al 1% y L-glutamina al 1%, piruvato de sodio al 1%, HEPES 1 mM y β -mercaptoetanol 50 μ M se añadieron al medio de células T.

5 5.2 Animales

Los ratones transgénicos para un receptor de células T CD8+ específico para ovoalbúmina (OT-1) y para un receptor de células T CD4+ específico para ovoalbúmina (OT2) se obtuvieron del Jackson Laboratory, EE. UU., y se criaron en nuestras instalaciones para animales en condiciones sin patógenos específicos (SPF). Los ratones C57BL/6 de tipo salvaje se adquirieron en Janvier, Francia.

5.3 Clasificación y transducción de células T CD4+

El vector retroviral pMP71 (Schambach y col., Mol Ther 2(5) (2000), 435-45; EP-B1 0 955 374) para la transfección de la línea celular de empaquetamiento ecotrófico Plat-E (Platinum-E). La transducción se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Leisegang y col., J Mol Med 86 (2008), 573-83; Mueller y col., J Virol. 86 (2012), 10866-10869; Kobold y col., J Natl Cancer Inst (2014), en prensa. En resumen, la línea celular de empaquetamiento Plat-E (como se describe en Morita y col., Gene Ther 7 (2000), 1063-6) se sembró en placas de 6 pocillos y se cultivó durante la noche hasta 70 - 80% de confluencia. El primer día, se mezclaron 18 μ g de ADN junto con CaCl_2 100 mM (Merck, Alemania). Las células Plat-E se incubaron durante 6 h con el ADN precipitado. A continuación, se retiró el medio y se intercambió con medio de cultivo. El segundo día, se recolectaron esplenocitos primarios de ratones C57BL/6 (Harlan Laboratories, Países Bajos) y se clasificaron para células T CD4+ con un kit de aislamiento de células T MACS CD4+ (L3T4) (Miltenyi Biotec, Alemania). Las células T CD4+ se estimularon con anti-CD3 (clon 145-2cll BD Pharmingen, EE. UU.), anti-CD28 (clon 37.51, BD Pharmingen, EE. UU.), IL-2 murina recombinante (Peprotech, Alemania) y β -Mercaptoetanol 50 μ M en medio de células T durante la noche. El tercer día, se recubrieron placas de 24 pocillos con 12,5 μ g/ml de retronectina recombinante (Takara Biotech, Japón) durante 2 h a temperatura ambiente, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% (Roth, Alemania) durante 30 min a 37 °C y se lavaron con PBS. El sobrenadante que contenía virus de los cultivos de Plat-E se recogió y se pasó a través de un filtro (45 μ m, Millipore, EE. UU.). A continuación, se añadió medio de células T fresco a las células Plat-E. Se distribuyó un ml de sobrenadante filtrado en cada pocillo de las placas de 24 pocillos y se espinoculó durante 2 h a 4 °C. A continuación, se retiró el sobrenadante de la placa de 24 pocillos, se sembraron 1×10^6 células T en un ml de medio de células T complementado con 100 U de IL-2 y 400.000 perlas anti-CD3 de ratón y anti-CD28 de ratón (Invitrogen, Alemania) por pocillo y se espinoculaban a 800 x g durante 30 min a 32 °C. En el día cuatro, el sobrenadante de Platinum-E se recogió de nuevo y se filtró. Se añadió un ml del sobrenadante filtrado a cada pocillo de la placa de 24 pocillos y se espinoculó a 800 x g durante 90 min a 32 °C. Las células se incubaron posteriormente durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente, las células se recogieron, se contaron y se volvieron a sembrar a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio de células T complementado con 10 ng de IL-15 por ml (Peprotech, Alemania) y β -Mercaptoetanol 50 μ M. Las células T se mantuvieron a esta densidad hasta el día 10, cuando se realizaron análisis celulares o ensayos funcionales.

5.4 Ensayos de células T funcionales

Para los ensayos de estimulación basados en anticuerpos, se prepararon placas de 96 pocillos mediante recubrimiento con PBS (solución de vehículo) que contenía anticuerpo anti-CD3 murino (100 ng/ml, clon 145-201, eBioscience) solo o en combinación con anticuerpo anti-CD28 (2 μ g/ml, clon 37.51, eBioscience) o quimera Fc de PD-L1 recombinante (5 μ g/ml, R&D Systems) durante 12 horas a 4 °C. También se prepararon pocillos que contenían solo PBS como controles. Posteriormente, se añadieron 300.000 células T por pocillo y se incubaron durante 36 horas. Las células se contaron mediante la adición de perlas de recuento (Life Technologies, Alemania; número de catálogo: C36950) y el posterior análisis de proliferación, viabilidad y fenotipo mediante citometría de flujo (como se describe a continuación). Las citocinas se cuantificaron en los sobrenadantes mediante ELISA (para IL-2 e IFN- γ , ambos BD de acuerdo con las instrucciones del fabricante).

Para la proliferación de células T y el análisis de fenotipos en experimentos de cocultivo de células tumorales, se estimularon células T CD8+ y/o CD4+ transducidas o no transducidas en una placa de 96 pocillos previamente recubierta con anticuerpo anti-CD3e murino y PD-L1 murino recombinante como se describió anteriormente a $0,3 \times 10^6$ células por pocillo (para células CD4+ aislados, $0,15 \times 10^6$ células por pocillo) durante 36 horas (el final de la estimulación fue el punto de tiempo 1). Cuatro horas antes del final de la estimulación, se sembraron $0,030 \times 10^6$ células tumorales PancOVA por pocillo (en los experimentos con células CD4+ aisladas, $0,04 \times 10^6$ células PancOVA por pocillo) en una nueva placa de 96 pocillos. Al final de la estimulación de 36 horas, dos tercios del volumen de un pocillo que contenía las células T preestimuladas se añadieron a un pocillo que contenía las células tumorales diana y se cocultivaron durante 12 horas adicionales (punto de tiempo 2). Las células se contaron mediante la adición de perlas

de recuento (Life Technologies, Alemania). Los fenotipos de células T (CD62L, CCR7) y los marcadores de activación (CD69, PD-1) se determinaron mediante citometría de flujo (como se describe a continuación) en los puntos de tiempo 1 y 2.

- 5 Para los ensayos de destrucción *in vitro*, se estimularon células T CD8+ y/o CD4+ transducidas o no transducidas por pocillo durante 36 horas como se describió anteriormente con anticuerpo anti-CD3e y quimera Fc de PD-L1 recombinante. Cuatro horas antes del final de la estimulación, las células tumorales se sembraron en una placa de 96 pocillos como se describió anteriormente. El número exacto de células tumorales dependía de las células tumorales aplicadas: 0,03 - 0,040 x10⁶ PancOVA y 0,02 x10⁶ EG7-PD-L1. Después de la estimulación, se añadieron dos tercios del volumen de un pocillo que contenía las células T preestimuladas a un pocillo que contenía las células tumorales diana. Los cocultivos duraron de 8 a 18 horas, dependiendo de las células tumorales aplicadas (8 horas para las células tumorales PancOVA, 18 horas para EG7-PDL1). A continuación, se recogió el sobrenadante y se analizó la capacidad de destrucción de células T utilizando un ensayo de citotoxicidad basado en LDH (Promega, EE. UU.) o ELISA de granzima B murina (R&D Systems, EE. UU.). Los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes se cuantificaron mediante ELISA (IFN-γ, BD).

- Para los experimentos *in vivo*, se inyectaron 200.000 células EG7-PD-L1 por vía subcutánea por ratón. Cuando los tumores eran palpables, se inyectaron por vía intravenosa 10x10⁶ células T transducidas con PTM u OT-1 no transducida por ratón a través de la vena de la cola. El tamaño del tumor se midió cada 2-3 días, y los ratones se sacrificaron cuando los tumores habían alcanzado un tamaño máximo de 225 mm². Los ratones curados y los animales de control se volvieron a desafiar con 30.000 células tumorales (por ratón, nuevamente inyectadas por vía subcutánea) 30 días después del rechazo tumoral.

5.5 Citometría de flujo

- La citometría de flujo multicolor se realizó utilizando un BD FACS Canto II (BD Bioscience, Alemania) y se utilizaron los siguientes paneles de anticuerpos.

- Para los ensayos de estimulación basados en anticuerpos, las células se tiñeron con colorante de viabilidad fijable (AmCyan, BioLegend), CD4 anti-ratón (PacBlue, clon GK1.5, BioLegend) y PD-1 anti-ratón (clon 29F de APC. 1A12, BioLegend). Las células se fijaron posteriormente y se permeabilizaron. Después de la tinción intracelular con anti-Ki67 (PE, clon 16A8, BioLegend) y anti-EOMES (PeCy7, clon Danllmag, eBioscience), las células se lavaron y se resuspendieron en PBS que contenía Count Bright Absolute Counting Beads (Life Technologies, EE. UU.). Alternativamente, se incluyeron anti-IL17 (FITC, clon TCI 1-18H10.1, BioLegend) y anti-FoxP3 (PE, clon 150D, BioLegend) en el proceso de tinción intracelular para la diferenciación de subconjuntos de células T específicos.

- Para los experimentos de fenotipado, las células se tiñeron con colorante de viabilidad fijable (AmCyan, BioLegend), CD8a anti-ratón (APCCy7, clon 53-6.7, BioLegend), CD4 anti-ratón (PE, clon GK1.5, BioLegend), CD62L anti-ratón (PacBlue, clon MEL-14, BioLegend), CCR7 anti-ratón (PerCP/Cy5.5, clon 4B12, BioLegend), CD69 anti-ratón (PeCy7, clon H1.2F3, BioLegend) y PD-1 anti-ratón (APC clon 29F.1A12, BioLegend).

5.6 Resultados:

5.6.1 Análisis funcional y fenotípico de células T CD4+ transducidas *in vitro*

- Para evaluar la funcionalidad de la proteína de fusión PD-1-transmembrana PD-1-CD28 murina (PTM, SEQ ID NO: 13 (ADNc) y 14 (proteína)), se transdujeron células T CD4+ murinos primarios y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 agonistas o anticuerpos anti-CD3 agonistas en combinación con PD-L1 recombinante (SEQ ID NO: 29 y 30) o anticuerpos anti-CD28. Las células T CD4+ transducidas con PTM mostraron un marcado aumento de IFN-γ (19998 frente a 291 pg/ml, p < 0,001, Figura 9A) en comparación con las células T CD4+ no transducidas. La activación del receptor de PTM dio como resultado mejoras estadísticamente significativas de la proliferación y la viabilidad en relación con los controles (para la proliferación: 151 frente a 68 células por perla (anticuerpo anti-CD3 y PD-L1 recombinante frente a anticuerpo anti-CD3, respectivamente), p < 0,001 Figura 9B; y para la viabilidad: 60% frente a 40%, (anticuerpo anti-CD3 y PD-L1 recombinante frente a anticuerpo anti-CD3, respectivamente), p < 0,001, Figura 9C). Este aumento en el número de células se asoció con una fuerte regulación positiva de ki67 y eosmesdermina/Tbr2 (EOMES), lo que indica una fuerte actividad mitótica y una transcripción mejorada/estado de activación pronunciado (Figura 9D y 9E, respectivamente).

- La activación del receptor PTM tampoco se asoció con ningún aumento en la producción de IL-17 o FoxP3. La expresión de IL-17 y FoxP3 en células T CD4+ transducidas con PTM fue similar a la de las células de control (Figura

10A y 10B, respectivamente), lo que indica que la activación del receptor de PTM no da como resultado un cambio fenotípico hacia un subtipo de células Th17 o Treg dentro de la población de células T auxiliares.

El cocultivo de células T transducidas con PTM preestimuladas con células PancOVA dio como resultado una
 5 disminución del porcentaje de células efectoras y un aumento del porcentaje de células T de memoria central para las poblaciones CD8+ (Figuras 11A Y 11B) y CD4+ (Figuras 11C y 11D). Estos resultados también pueden explicar parcialmente la actividad favorable de las células T transducidas con PTM *in vivo*, ya que se ha descrito que las células T de memoria central tienen una actividad efectora antitumoral mejorada en relación con las células T de memoria efectoras. La expresión del marcador de activación temprana CD69 disminuyó durante el cocultivo para células T
 10 CD4+ y CD8+ transducidas o no transducidas con PTM (Figuras 11E y 11F), mientras que la expresión del marcador de activación tardía PD1 aumentó (Figura 11G).

5.6.2 Eficacia terapéutica de células T transducidas con proteína de fusión PD-1-CD28 en un modelo de cáncer pancreático murino

15 Se utilizaron células T específicas de antígeno transducidas con proteína PD-1-CD28 (PTM; SEQ ID NO: 13 (ácido nucleico (ADNc)); 14 (proteína)) (células T OT-1 como se describe en los Ejemplos 2 y 3), para tratar ratones con tumores EG7-PD-L1 subcutáneos. Ratones portadores de tumores similares tratados con PBS o células T OT-1 no transducidas sirvieron como controles. Las células T transducidas con el receptor de PTM también indujeron una
 20 inmunidad antitumoral superior en este modelo en comparación con los ratones de control (Figura 12A) mejorando significativamente la supervivencia ($p = 0,03$; Figura 12B). Cuando se volvieron a exponer a células EG7-PD-L1, los ratones tratados previamente con PTM transducida se curaron eficazmente y permanecieron libres de tumores en comparación con los ratones sin tratamiento previo de control (Figura 12C).

25

REIVINDICACIONES

1. Una célula transducida para expresar una proteína de fusión PD1-CD28 para su uso en el tratamiento de un cáncer caracterizado por la expresión de un ligando para PD-1, donde dicha proteína de fusión PD-1- CD28 comprende (a) un polipéptido PD-1 que comprende el dominio extracelular y transmembrana de un polipéptido PD-1 y (b) el dominio intracelular de un polipéptido CD28, y donde dicha célula es una célula T, una célula asesina natural (NK), una célula infiltrante de tumores (TIL), una célula mieloide o una célula mesenquimal.
2. La célula según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, donde dicha célula es una célula T que es una célula T CD4+, una célula T CD8+ o una célula T $\delta\gamma$.
3. La célula según la reivindicación 1 o 2 para el uso según la reivindicación 1 o 2, donde dicho ligando para PD-1 es PD-L1 o PD-L2.
4. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de colon, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, carcinoma esofágico, glioma, cáncer urotelial, retinoblastoma, cáncer de mama, linfoma no Hodgkin, carcinoma pancreático, linfoma de Hodgkin, mieloma, carcinoma hepatocelular, leucemia, carcinoma de cuello uterino, colangiocarcinoma, cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello o mesotelioma.
5. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha célula es una célula T autóloga o alogénica.
6. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha célula expresa además un receptor de antígeno quimérico, un receptor de células T alfa/beta, un receptor de células T natural, un acoplador de células T anti-CD3 expresado como un polipéptido soluble o presentado como una proteína transmembrana en la superficie celular, o una proteína de fusión del receptor de células T.
7. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho polipéptido PD-1 está unido operativamente a través de su extremo C al extremo N de un dominio intracelular de un polipéptido CD28, donde el polipéptido PD-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o una secuencia que tiene 1 a 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con SEQ ID NO: 16, que se caracteriza por tener una actividad de unión a PD-L1 y/o PD-L2.
8. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho dominio transmembrana de PD-1 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
9. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho dominio intracelular de un polipéptido CD28 comprende las secuencias YMMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30).
10. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho dominio intracelular de un polipéptido CD28 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.
11. La célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha proteína de fusión consiste en SEQ ID NO: 24.
12. La célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicha proteína de fusión tiene
 - (a) un polipéptido PD-1 que comprende una secuencia que tiene de 1 a 10 sustituciones, deleciones o inserciones en comparación con la SEQ ID NO: 18 y que se caracteriza por tener una actividad de unión a PD-L1 y/o PD-L2;
 - (b) un dominio transmembrana de PD-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y
 - (c) un dominio intracelular de un polipéptido CD28 que comprende la secuencia de aminoácidos YMMN (SEQ ID NO: 29) y/o PYAP (SEQ ID NO: 30).

Figura 1

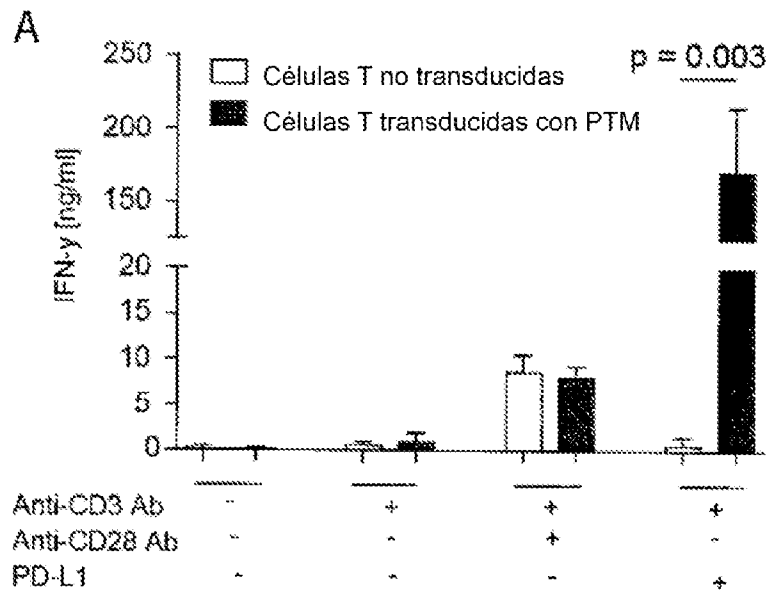


Figura 1 (continuación)

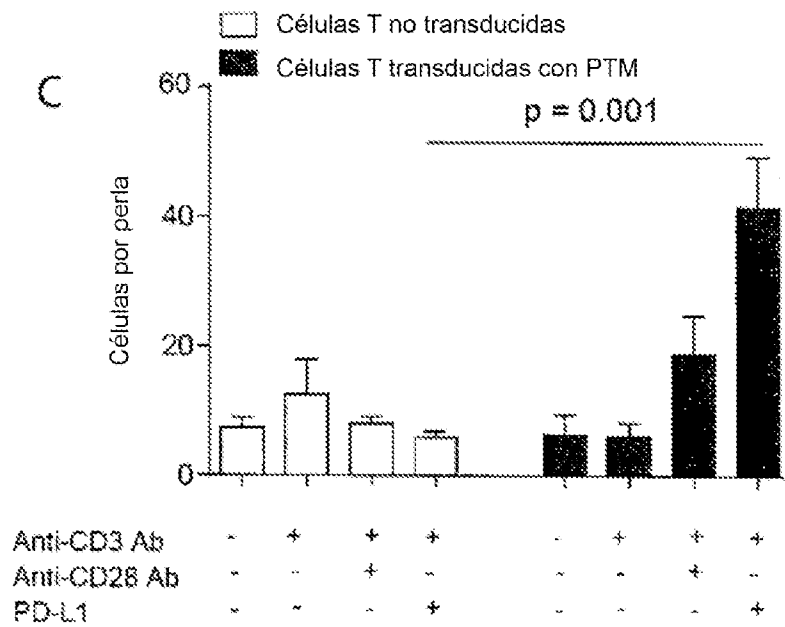
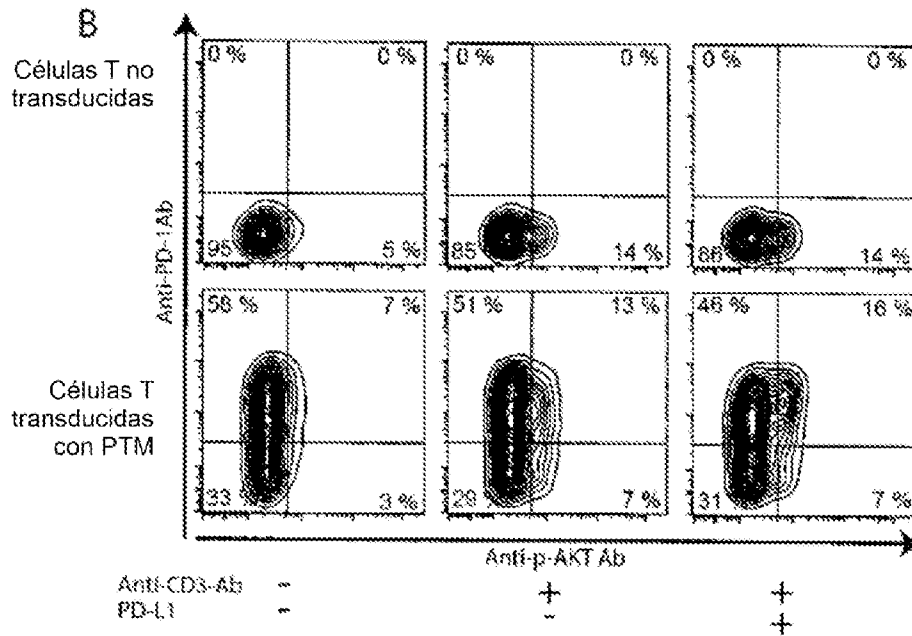


Figura 1 (continuación)

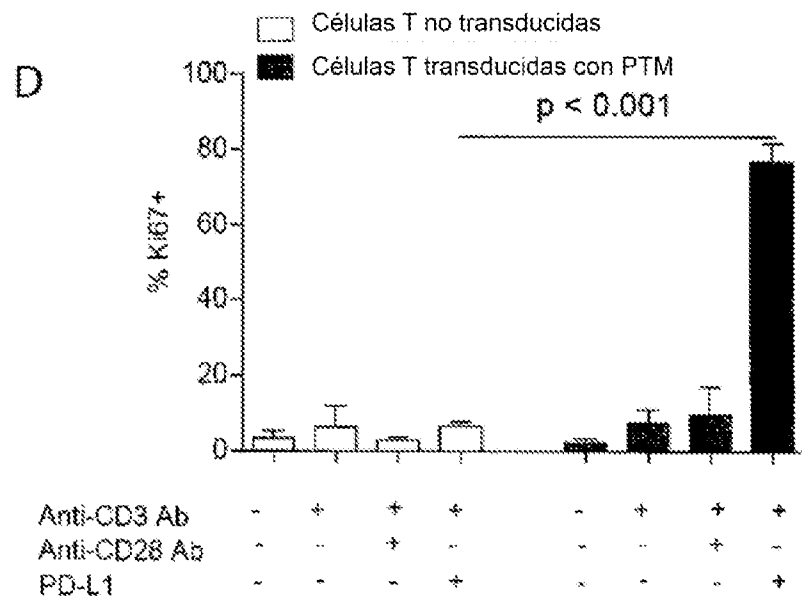


Figura 1 (continuación)

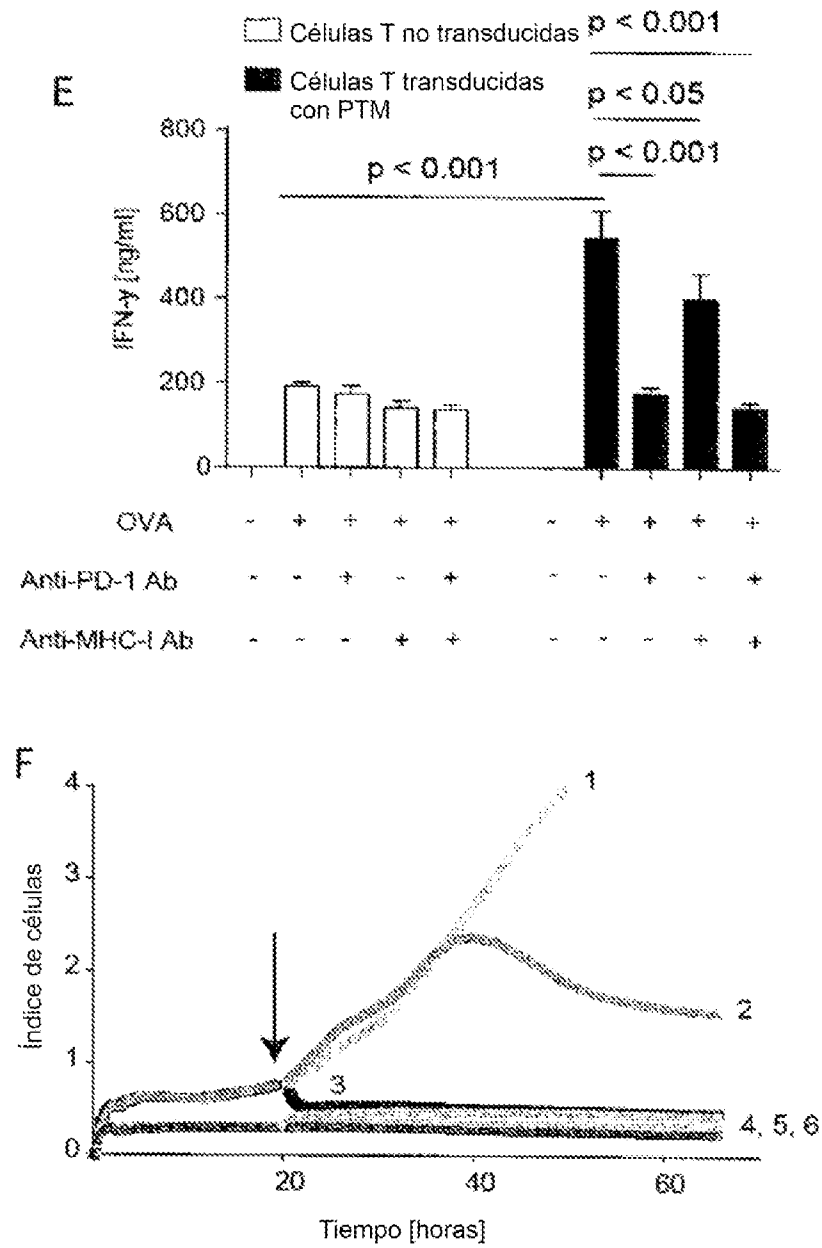


Figura 2

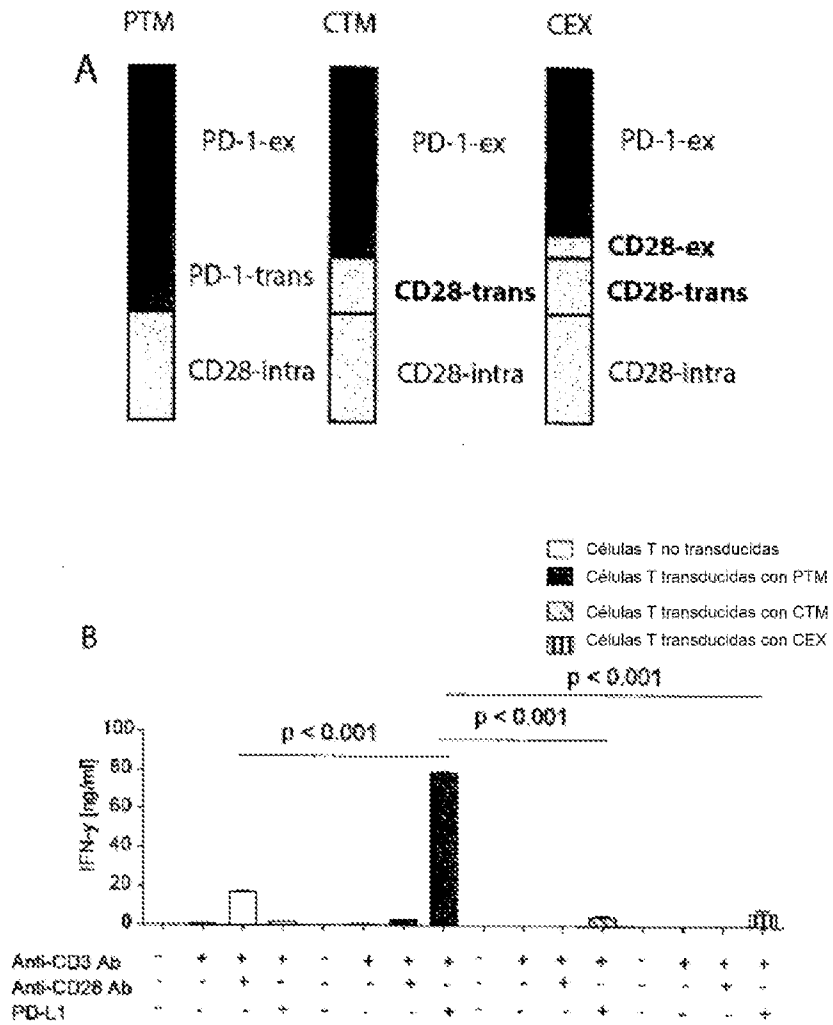


Figura 2 (continuación)

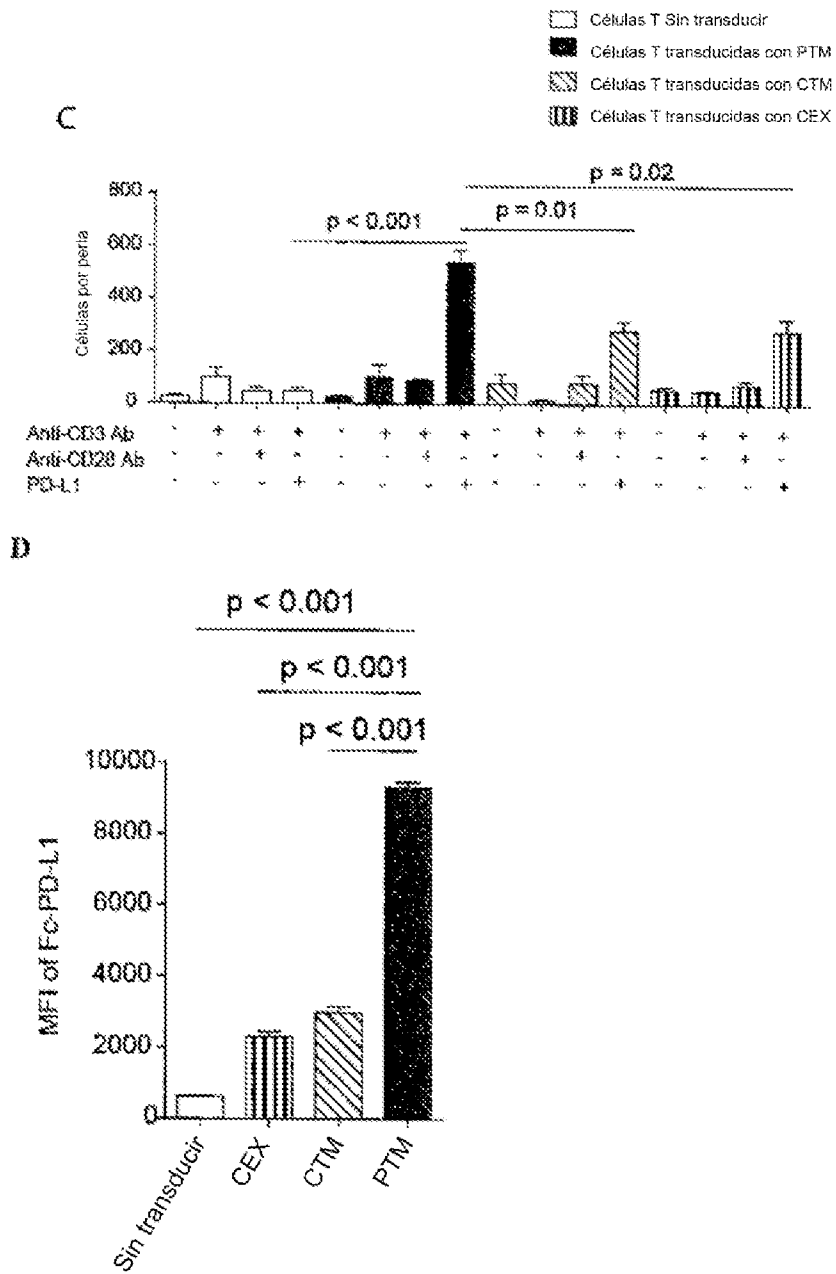


Figura 2 (continuación)

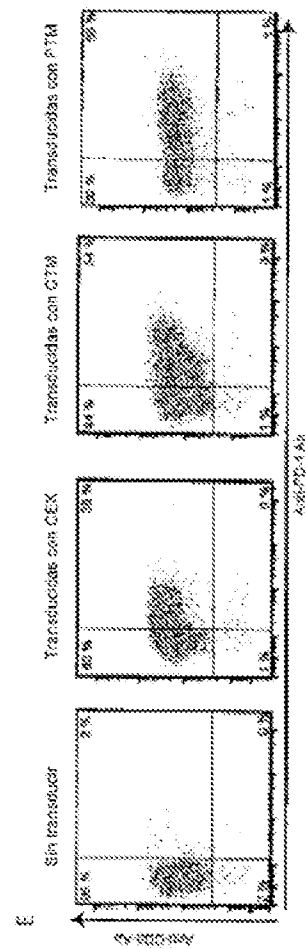


Figura 3

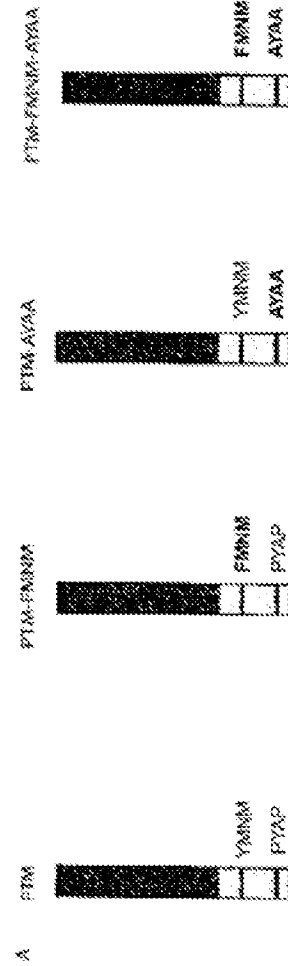


Figura 3 (continuación)

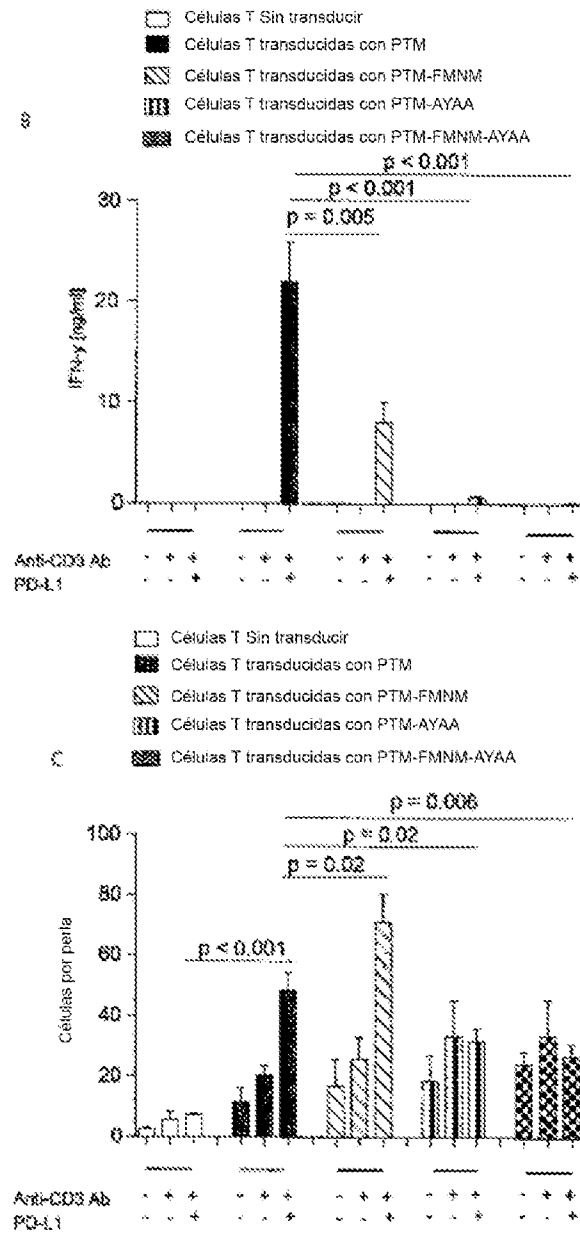


Figura 3 (continuación)

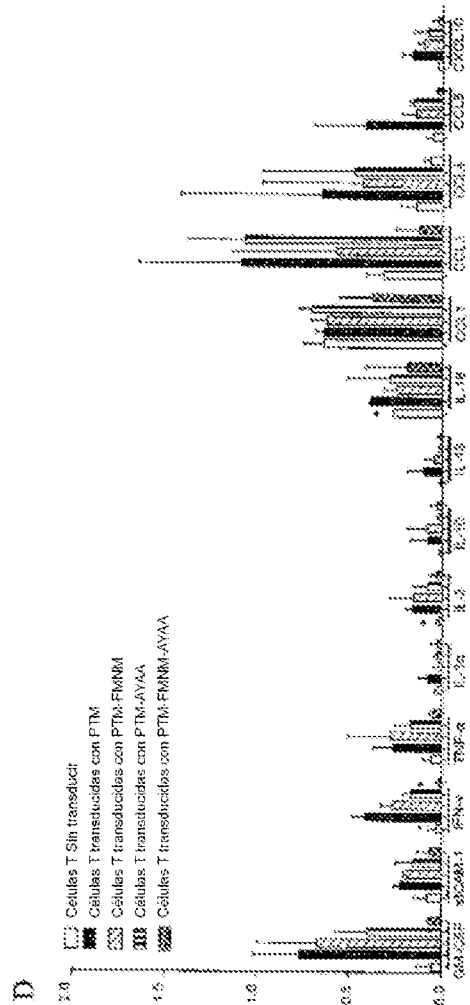


Figura 4

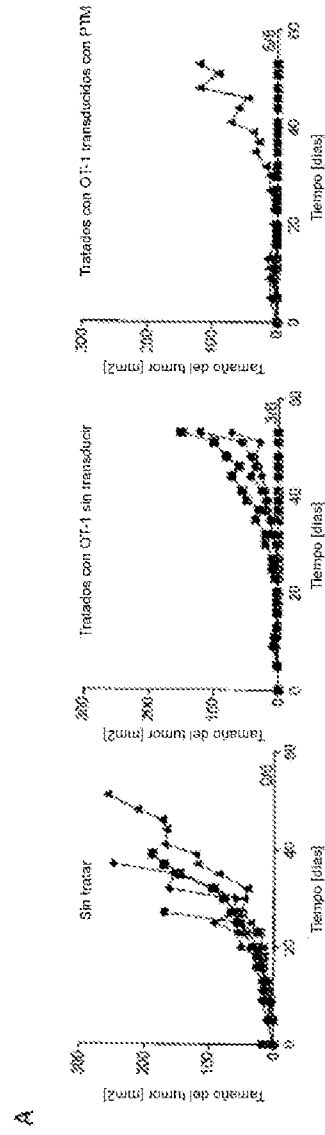
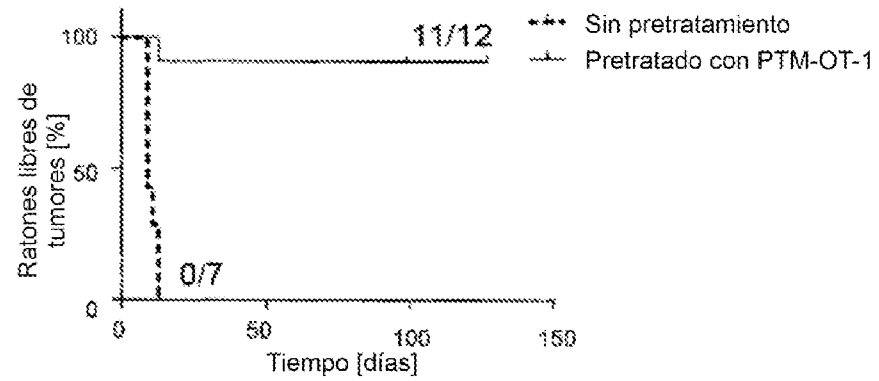


Figura 4 (continuación)

B

Volver a desafiar con Panc02-OVA

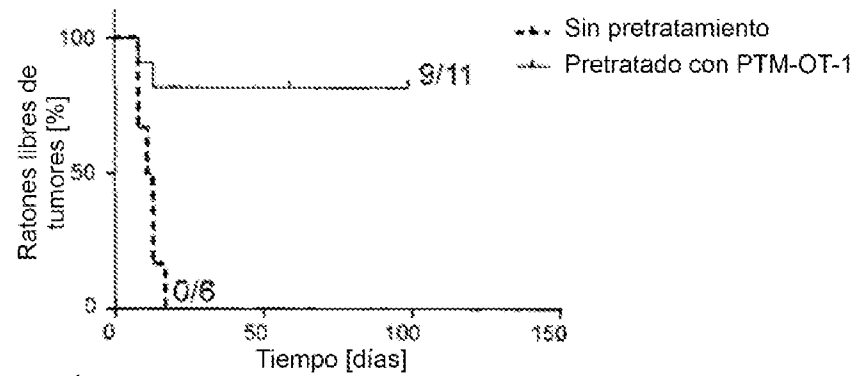


Números en riesgo

12	11	Sin pretratamiento
7	0	Pretratado con PTM-OT-1

C

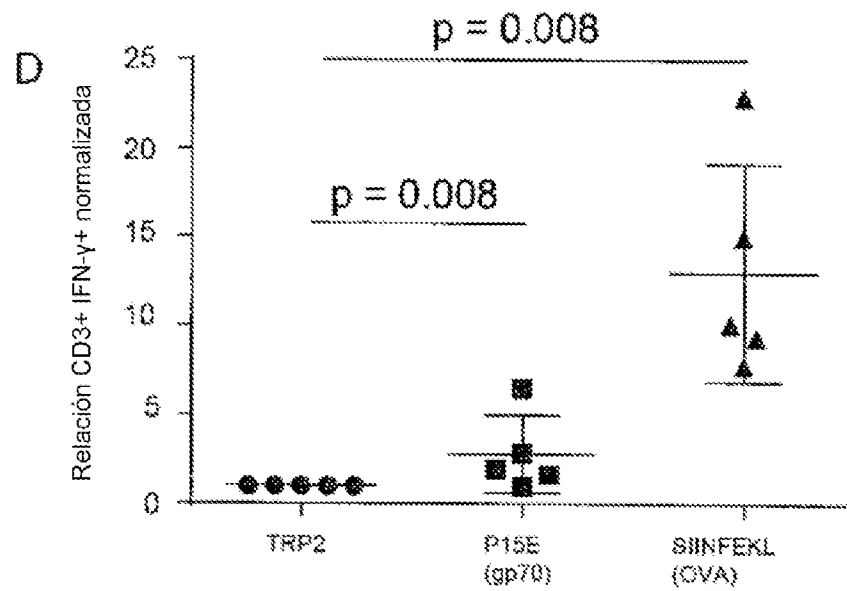
Volver a desafiar con Panc02



Números en riesgo

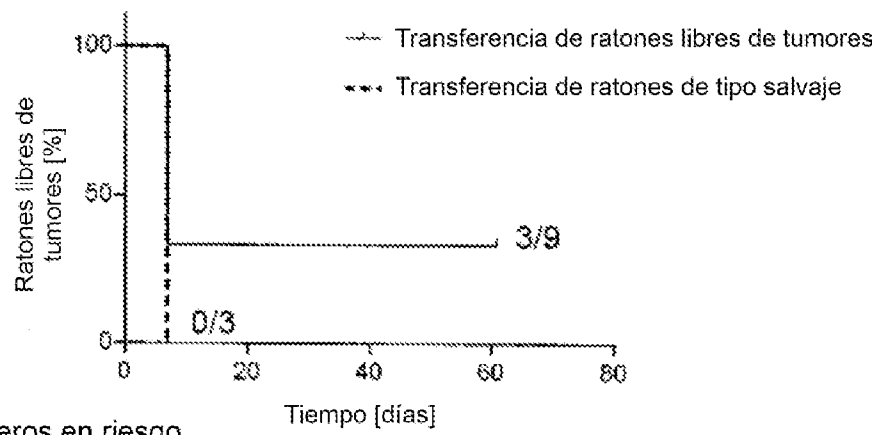
11	10	9	Sin pretratamiento
6	0		Pretratado con PTM-OT-1

Figura 4 (continuación)



E

Desafío con Panc02-OVA



Números en riesgo

9 3

Transferencia de ratones libres de tumores

3 0

Transferencia de ratones de tipo salvaje

Figura 5

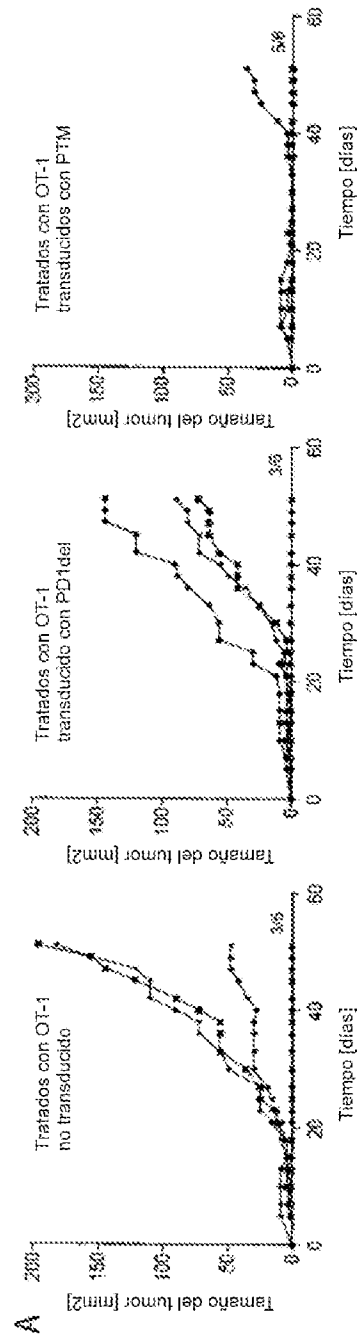


Figura 5 (continuación)

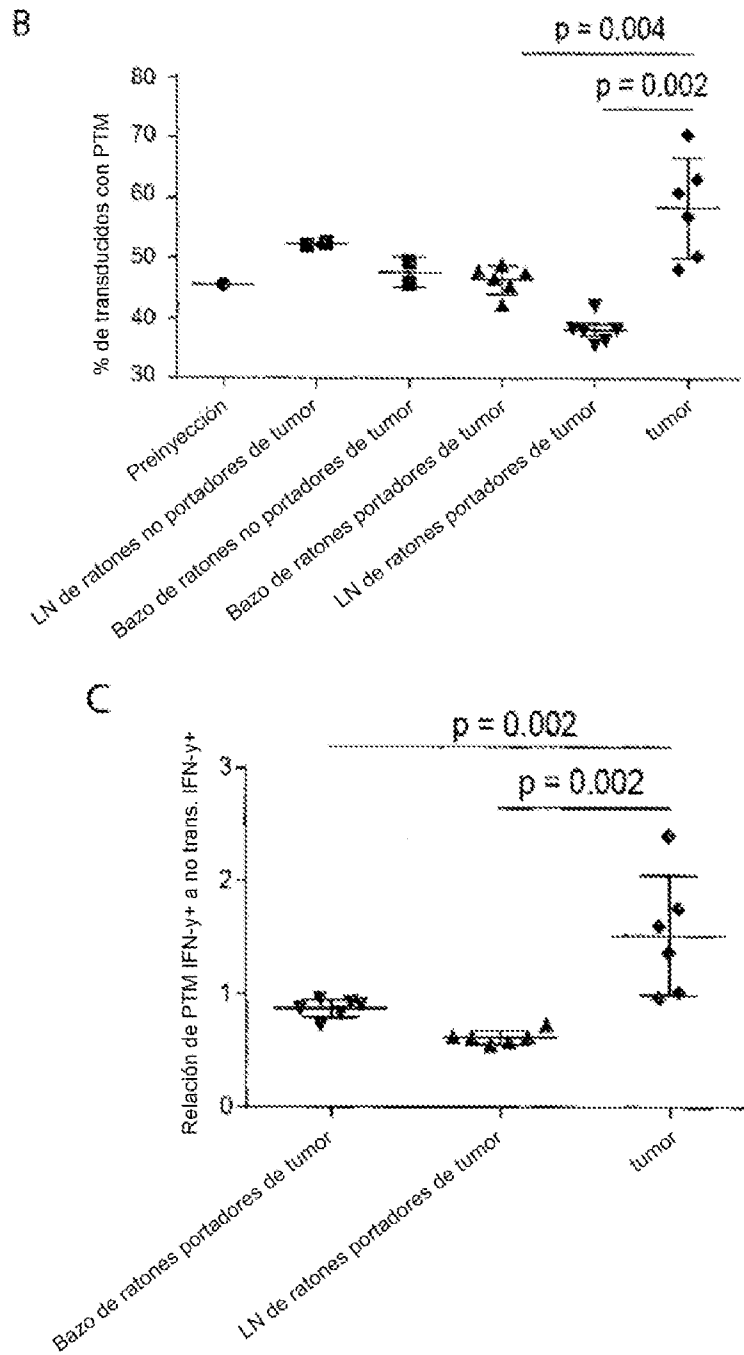


Figura 5 (continuación)

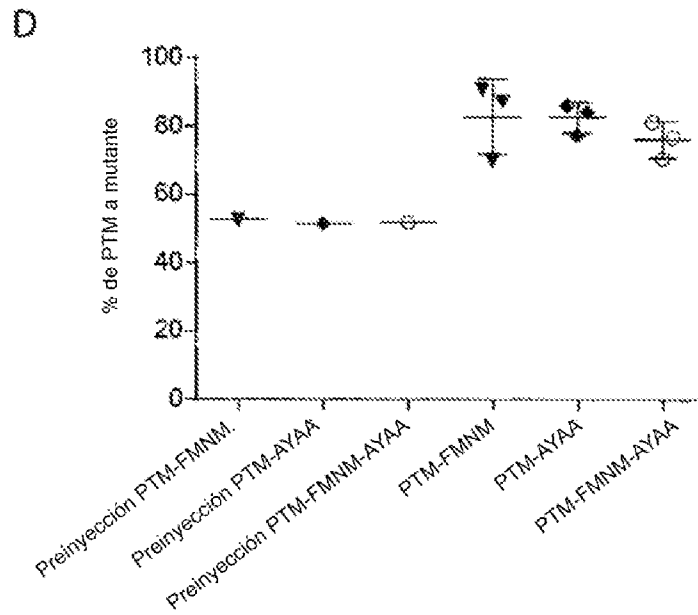


Figura 6

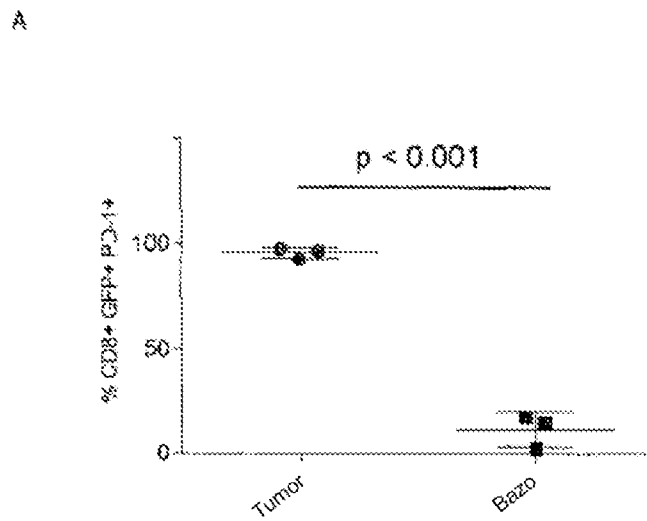
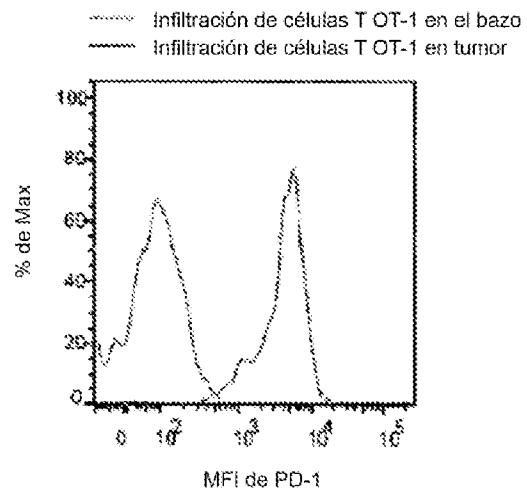


Figura 6 (continuación)

B



C

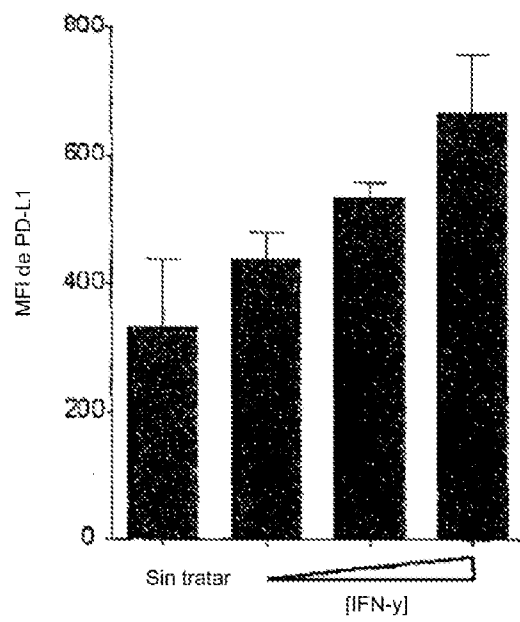
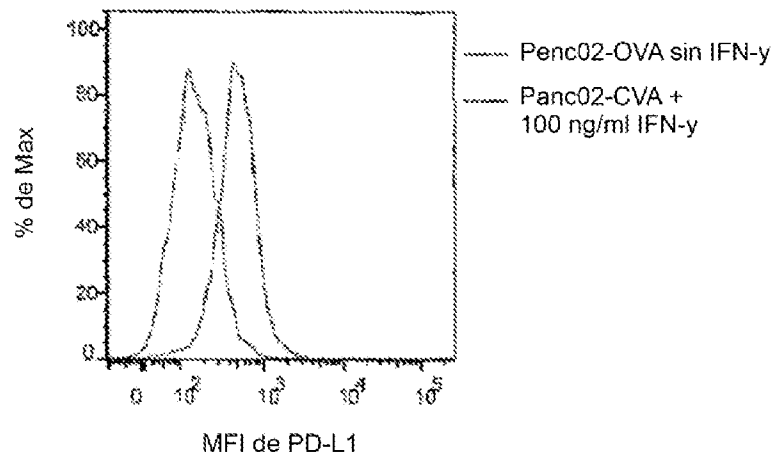


Figura 6 (continuación)

D



E

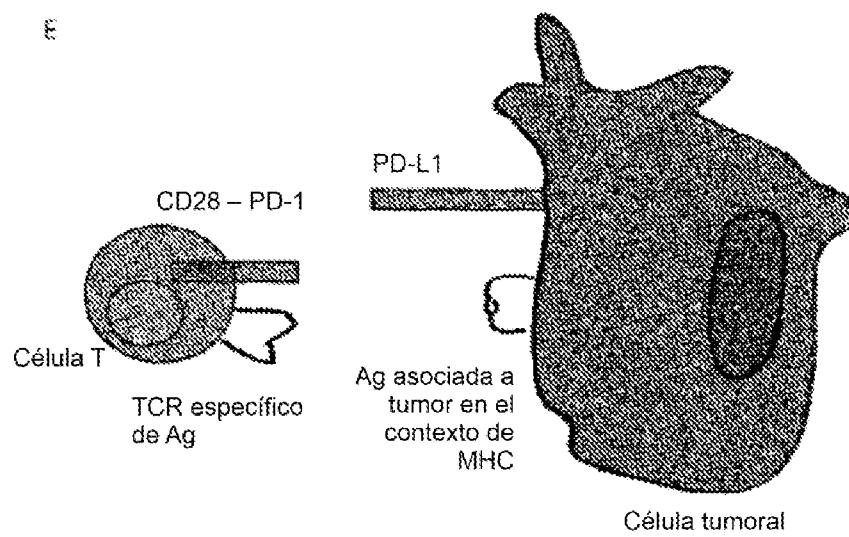


Figura 6 (continuación)

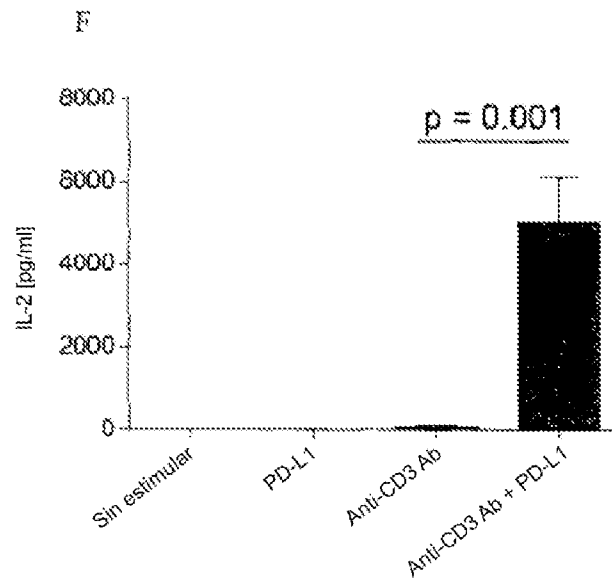


Figura 7

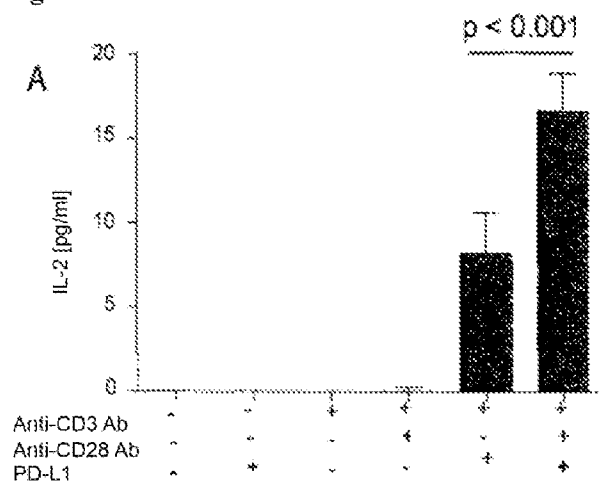


Figura 7 (continuación)

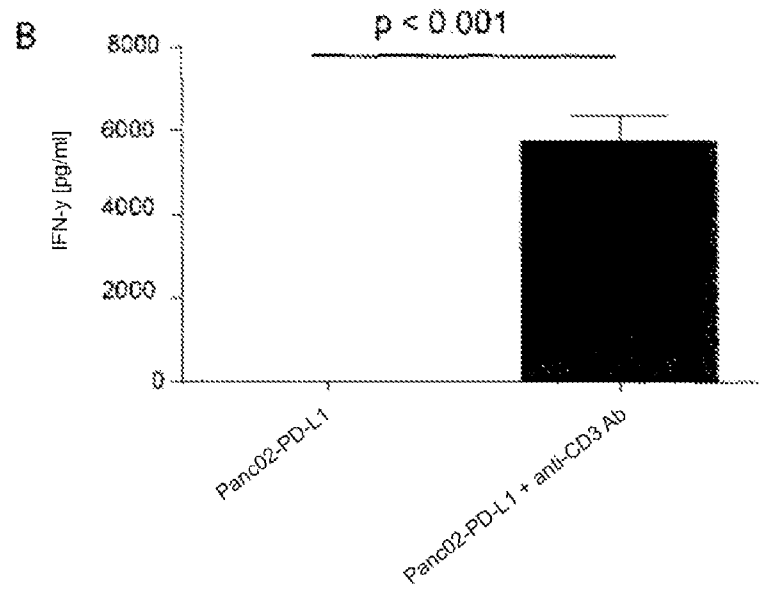


Figura 7 (continuación)

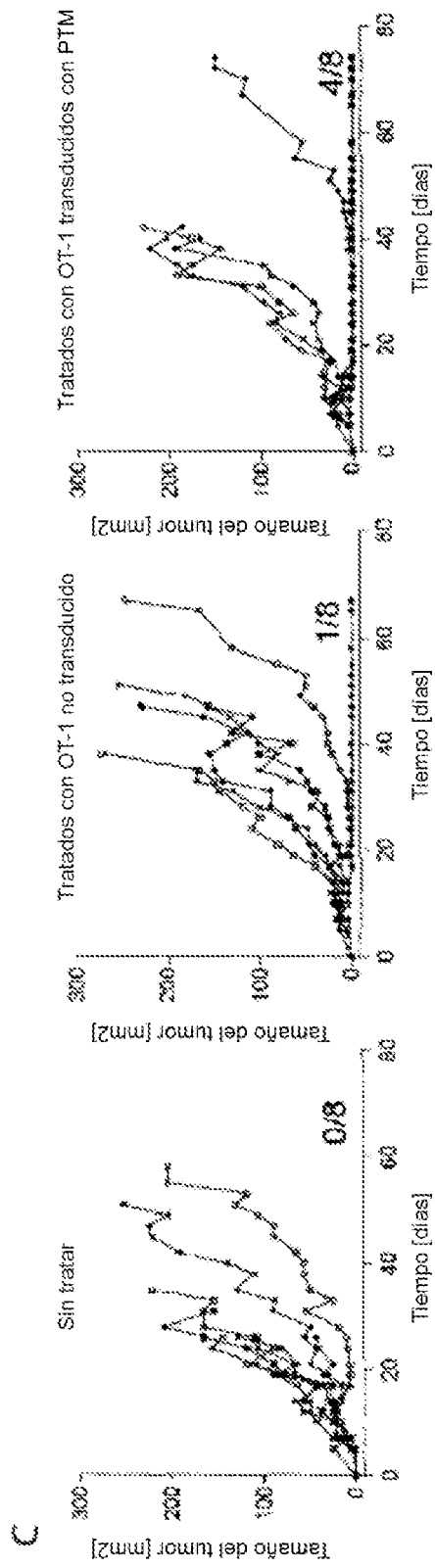


Figura 7 (continuación)

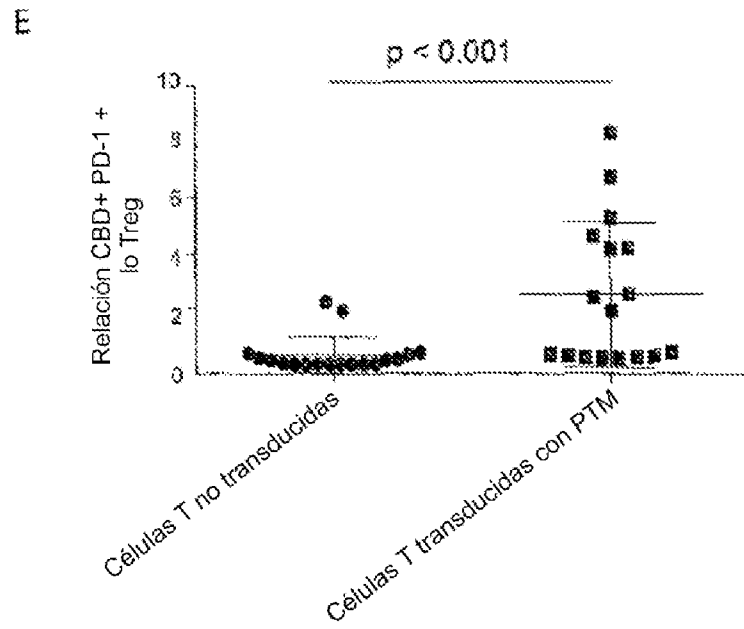
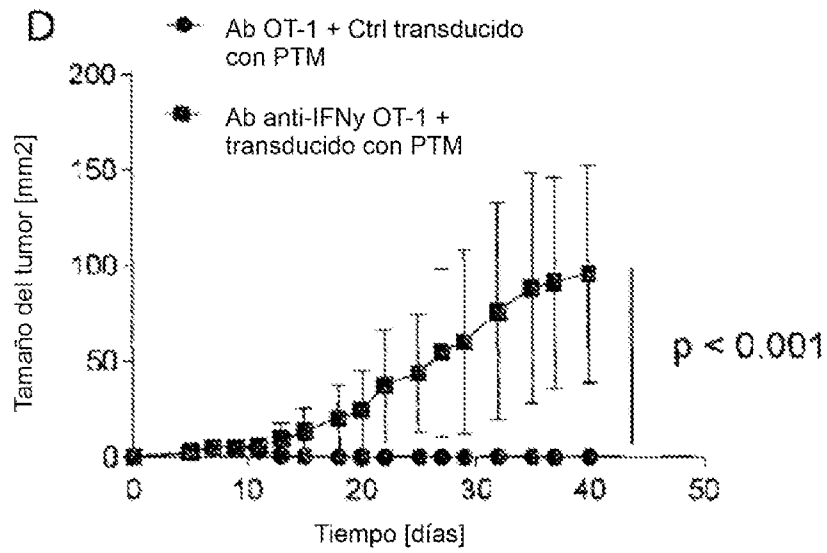


Figura 8

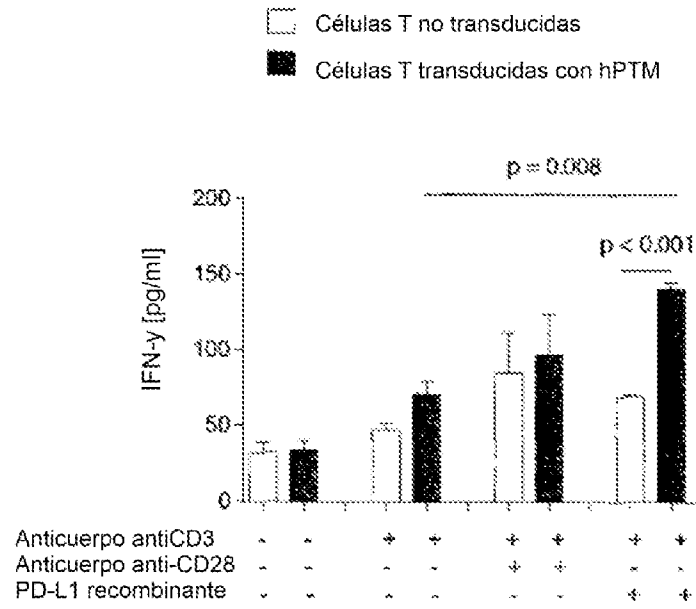
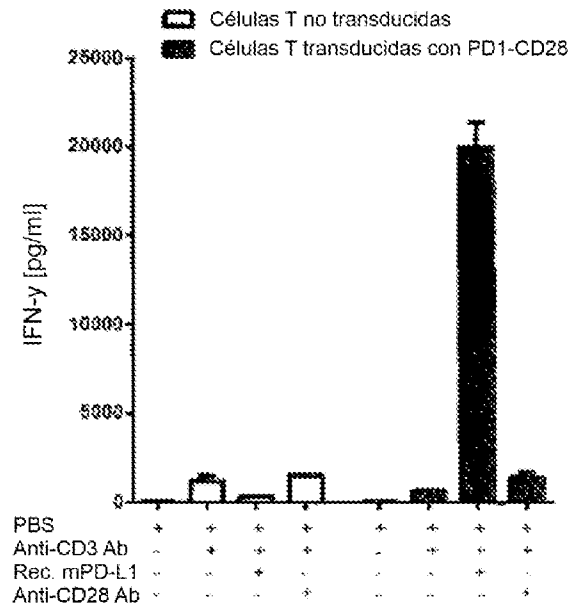


Figura 9

A



B

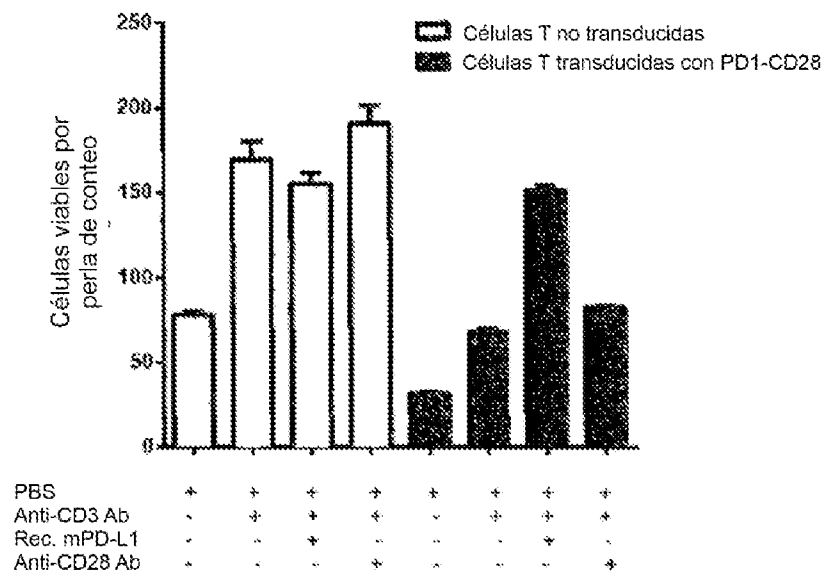
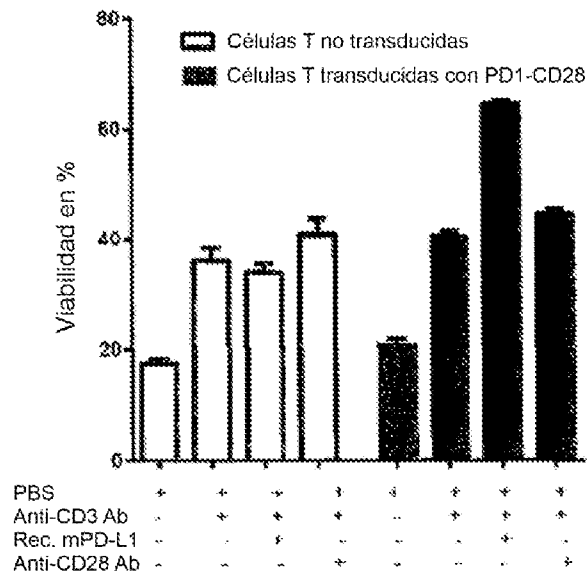


Figura 9 (continuación)

C



D

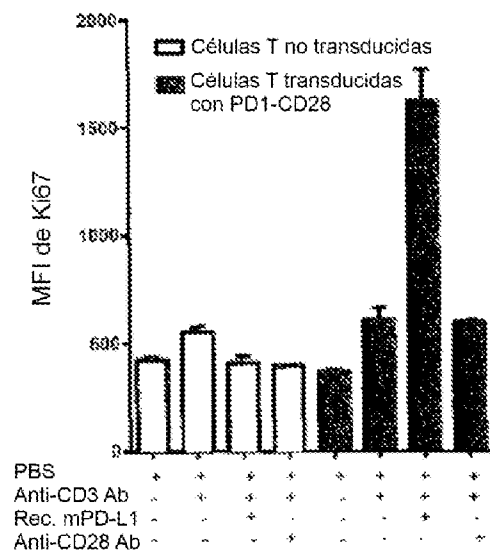


Figura 9 (continuación)

E

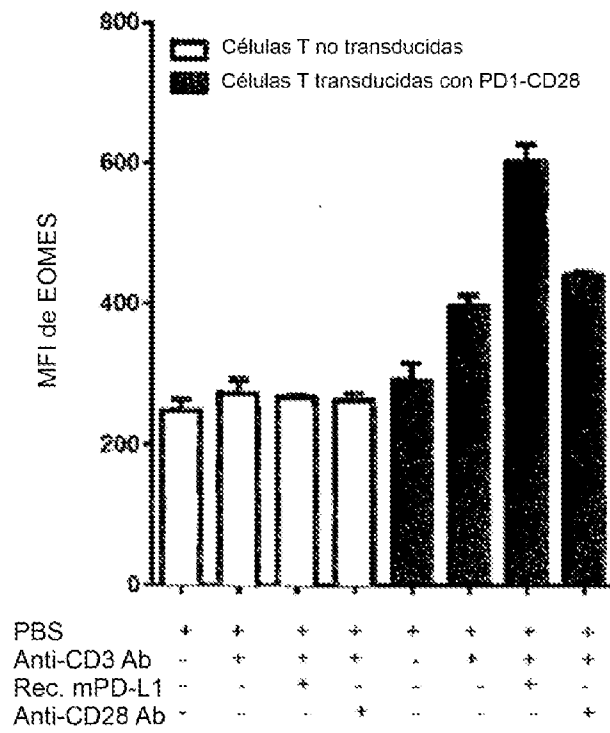


Figura 10

A

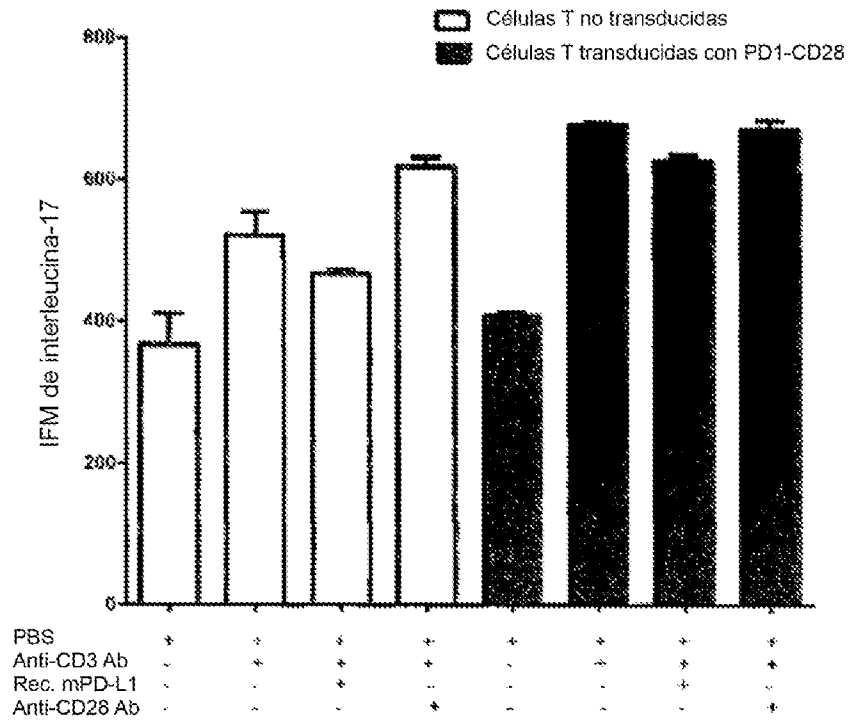


Figura 10 (continuación)

B

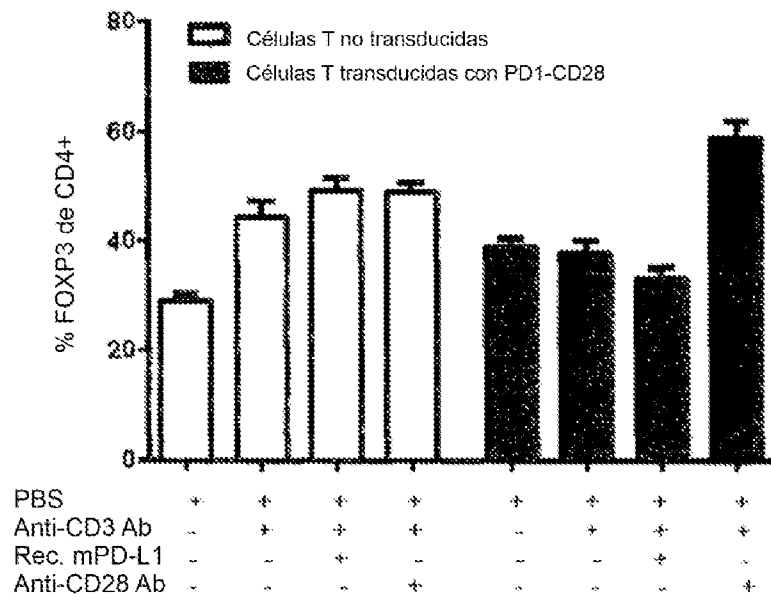


Figura 11

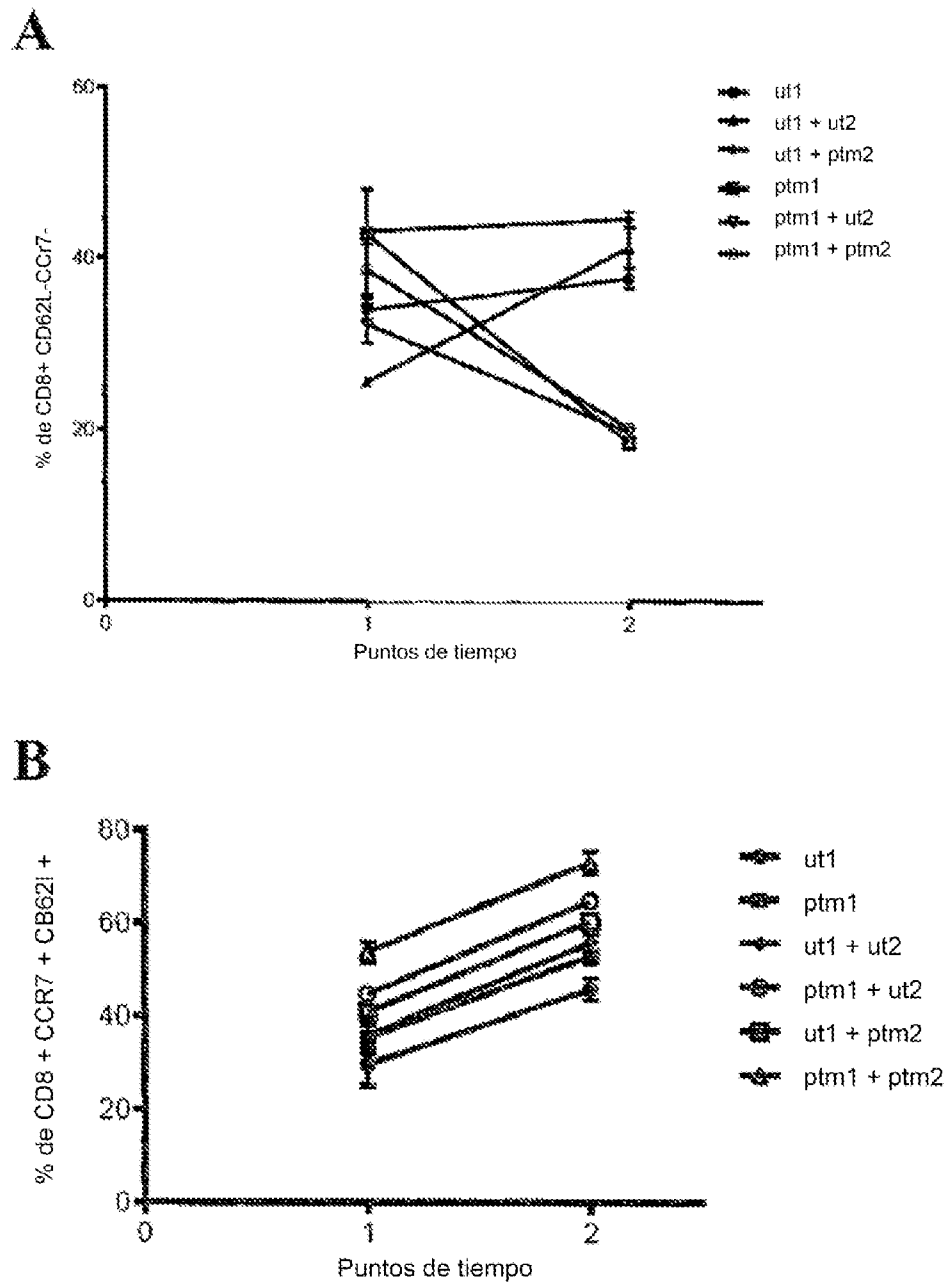
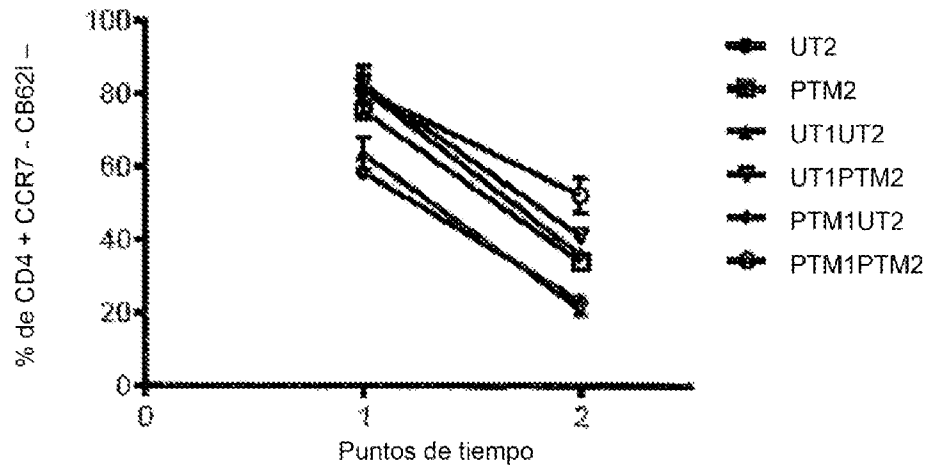


Figura 11 (continuación)

C



D

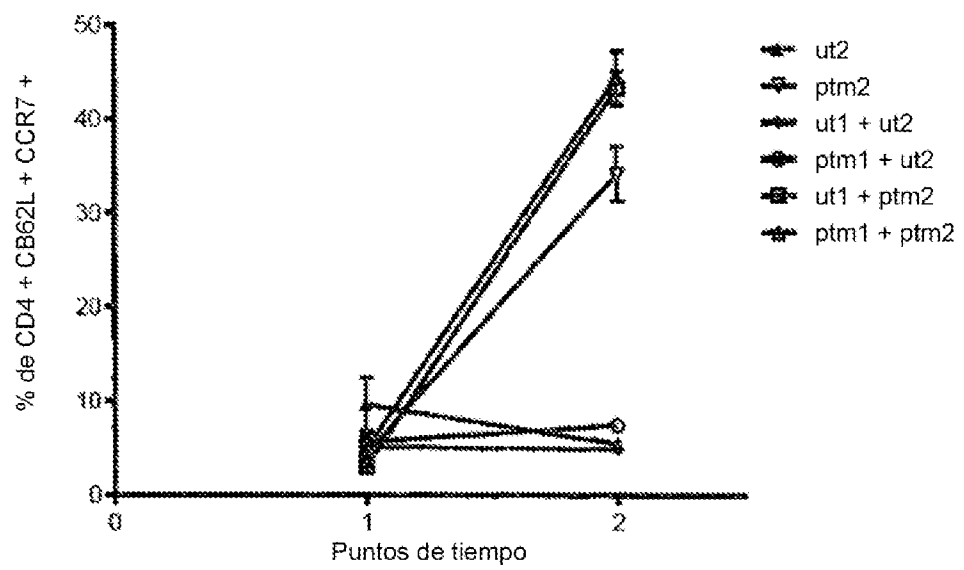
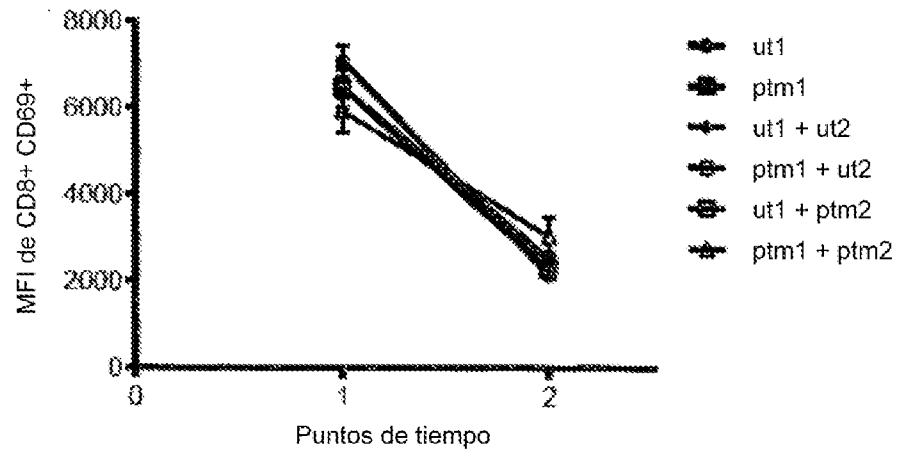


Figura 11 (continuación)

E



F

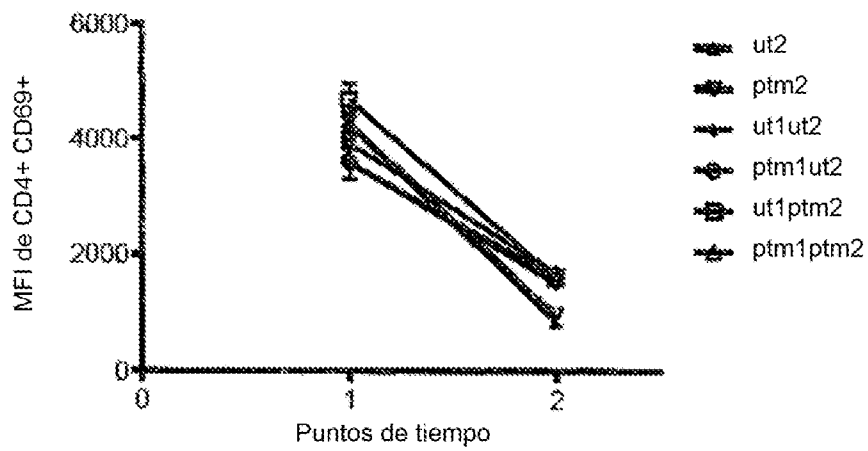


Figura 11 (continuación)

G

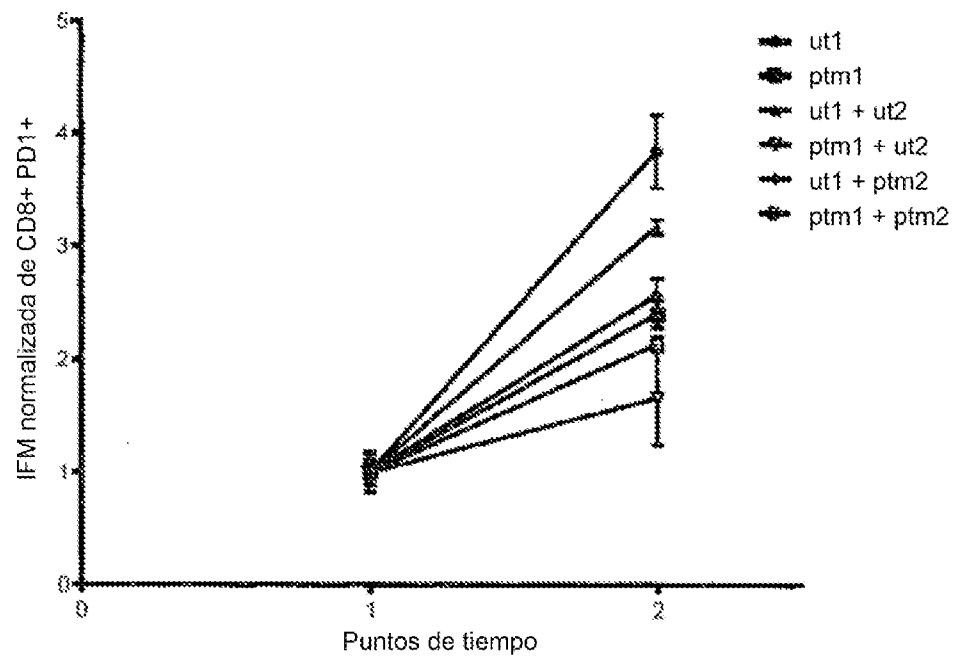


Figura 12

