

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 947 589**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2015** **PCT/US2015/058192**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016** **WO16122738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2015** **E 15880617 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2023** **EP 3250681**

54 Título: **Composiciones y métodos para el suministro de moléculas terapéuticas a linfocitos T**

30 Prioridad:

31.01.2015 US 201562110489 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.08.2023

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**ZHAO, YANGBING;
JUNE, CARL, H. y
LIU, XIAOJUN**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

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

ES 2 947 589 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

Composiciones y métodos para el suministro de moléculas terapéuticas a linfocitos T

Declaración sobre la investigación o el desarrollo patrocinados por vía federal

Esta invención se ha realizado con financiación gubernamental mediante el proyecto CA120409 concedido por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno posee determinados derechos sobre la presente invención.

Antecedentes de la invención

Los linfocitos T modificados genéticamente se han utilizado para tratar cáncer e inducir respuestas inmunitarias. Sin embargo, los linfocitos T modificados con CAR solos pueden no ser suficientes para tratar cánceres de manera eficiente, especialmente los cánceres sólidos. La inmunoterapia tumoral eficaz se ve impedida por obstáculos inmunitarios, como la capacidad de los tumores para fomentar un microambiente tolerante y la activación de una plétora de mecanismos inmunosupresores, que pueden actuar de manera coordinada para contrarrestar respuestas inmunitarias eficaces. Si bien una estrategia clínica obvia ha sido reforzar los mecanismos antitumorales, lograr el éxito clínico ha sido limitado. Los posibles mecanismos subyacentes a estos fallos clínicos incluyen las propiedades subestimadas de algunos tipos de células inmunitarias que pueden albergar actividad inmunosupresora, por ejemplo, atenuación de la muerte de células malignas mediante linfocitos T citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) CD8⁺ o células citolíticas naturales (Natural Killer, NK), simultáneamente con actividades protumorales que promueven la supervivencia, invasión y diseminación de células malignas. En el documento WO2014/172584 se indican linfocitos T modificados preparados mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un exodominio procedente del receptor de TGF-beta y un dominio endocelular procedente del receptor de señalización CD28.

A pesar de la mayor apreciación de la diversidad de mecanismos celulares que fomentan el desarrollo de tumores sólidos, la terapia contra el cáncer sigue dependiendo en gran medida de las modalidades citotóxicas, incluyendo quimioterapia (CTX) y radioterapia (RT), que destruyen las células que proliferan rápidamente (neoplásicas) en los tumores. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos mejorados para generar linfocitos T que puedan tratar cáncer e inducir respuestas inmunitarias *in vivo* como inmunoterapias adoptivas basadas en linfocitos T.

Sumario de la invención

En un aspecto, se proporciona, pero no forma parte de la presente invención, un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor, en donde la molécula interruptor comprende: un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo, o un dominio extracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo, en donde el linfocito T expresa transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce al linfocito T a secretar un factor de activación en un sitio diana.

En un aspecto, el dominio extracelular que comprende el receptor de membrana o un fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en el receptor beta del factor de crecimiento transformante (TGF-beta-R), muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL1), receptor de interferón-gamma (IFN-gamma) y cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, en donde el dominio intracelular que comprende el receptor de señalización o un fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en receptor de interleucina-2 (IL-2R), receptor de interleucina-12 (IL-12R), CD3, CD28, CD137, CD27, ICOS, OX40, y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto adicional, el factor de activación es una citocina soluble seleccionada del grupo que consiste en IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TNF, TGF, IFN, y fragmentos funcionales y variantes de los mismos. En otro aspecto más, en donde el ácido nucleico comprende ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético. En otros aspectos, el sitio diana es un tumor seleccionado del grupo que consiste en cáncer cerebral, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y combinaciones de los mismos. En otro aspecto adicional más, los linfocitos T se alojan en un sitio de tumor sólido o en un antígeno tumoral. En otro aspecto, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en antígeno asociado a tumores (Tumor Associated Antigen, TAA), antígeno vírico, antígeno reconocido por anticuerpo, y cualquier fragmento de los mismos y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones adicionales, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en p53, Ras, beta-catenina, CDK4, alfa-actinina-4, tirosinasa, TRP1/gp75, TRP2, gp100, Melan-A/MART1, gangliósidos, PSMA, HER2, WT1, EphA3, EGFR, CD20, MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, telomerasa, survivina y cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto más, el linfocito T está activado.

La invención también presenta un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula

interruptor, en donde la molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un IL-12R o un fragmento del mismo.

5 Además se incluye una población de linfocitos T modificados que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en un sitio diana.

10 Se proporciona también, pero no forma parte de la presente invención, un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión soluble, en donde la proteína de fusión soluble comprende un primer dominio de unión que comprende un scFv anti-CD28 y un segundo dominio de unión que comprende un scFv anti-PD-L1 o anti-TGFbRII. En una realización, la proteína de fusión soluble comprende además un dominio espaciador entre el primer y el segundo dominio de unión.

15 Además se incluye un linfocito T modificado que comprende: un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo; y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y un antígeno en un linfocito T activador, en donde el linfocito T expresa transitoriamente la molécula interruptor y secreta el anticuerpo biespecífico.

25 En un aspecto, el dominio extracelular que comprende el receptor de membrana o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización. En otro aspecto, el dominio extracelular que comprende el receptor de membrana o un fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en el receptor beta del factor de crecimiento transformante (TGF-beta-R), muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL1), receptor de interferón-gamma (IFN-gamma) y cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto más, el dominio intracelular que comprende el receptor de señalización o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en receptor de interleucina-2 (IL-2R), receptor de interleucina-12 (IL-12R), CD3, CD28, CD137, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el antígeno de la célula diana se selecciona del grupo que consiste en un antígeno asociado a tumor es(TAA), antígeno vírico, antígeno bacteriano, antígeno parasitario y cualquier fragmento de los mismos. En otras realizaciones, el antígeno de la célula diana se selecciona del grupo que consiste en el receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R), muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL1), receptor de interferón-gamma (IFN-gamma). En realizaciones adicionales, el antígeno de linfocitos T activadores se selecciona entre el grupo que consiste en CD3, CD4, CD8, receptor de linfocitos T (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquier fragmento de los mismos. En más realizaciones adicionales, el linfocito T se activa mediante la unión de la molécula interruptor a un ligando y la activación induce al linfocito T a secretar un factor de activación en un sitio diana. Adicionalmente, el linfocito T se activa al unirse al anticuerpo biespecífico y la activación induce al linfocito T a secretar un factor de activación en un sitio diana.

45 En realizaciones adicionales, en el factor de activación hay una citocina soluble seleccionada del grupo que consiste en IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TNF, TGF, IFN, y fragmentos funcionales y variantes de los mismos. En realizaciones adicionales, el sitio diana es un tumor seleccionado del grupo que consiste en cáncer cerebral, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y combinaciones de los mismos. Adicionalmente, en otras realizaciones, el linfocito T se aloja en un sitio de tumor sólido o en un antígeno tumoral. El antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en antígeno asociado a tumores (TAA), antígeno vírico, antígeno reconocido por anticuerpo, y cualquier fragmento de los mismos, y cualquier combinación de los mismos, o el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en p53, Ras, beta-catenina, CDK4, alfa-actinina-4, tirosinasa, TRP1/gp75, TRP2, gp100, Melan-A/MART1, gangliósidos, PSMA, HER2, WT1, EphA3, EGFR, CD20, MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, telomerasa, survivina y cualquier combinación de los mismos. En estas y otras realizaciones, uno cualquiera de los ácidos nucleicos puede comprender ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético.

60 También se incluye, pero no forma parte de la presente invención, una población de linfocitos T modificados que comprenden un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor y al menos uno de los ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión soluble y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y secretan la proteína de fusión soluble y/o el anticuerpo biespecífico.

65 Se proporciona, pero no forma parte de la presente invención, un método para suministrar un factor a un sitio diana. El método comprende introducir un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor en una población de células

que comprende linfocitos T modificados. La molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo. La población de células se administra a un sujeto que lo necesita, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana. En una realización, introducir el ácido nucleico comprende la electroporación del ácido nucleico. En un aspecto, la población de células se selecciona del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T. En otro aspecto, la población de células comprende células mononucleares de sangre periférica. En otro aspecto, la población de células comprende linfocitos T purificados. En otros aspectos, el método comprende además activar y expandir los linfocitos T antes de introducir el ácido nucleico. En una realización, los linfocitos T se activan con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. En aspectos adicionales, el dominio extracelular comprende el receptor de membrana o un fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en el receptor beta del factor de crecimiento transformante (TGF-beta-R), muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL1), receptor de interferón-gamma (IFN-gamma) y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones adicionales, el dominio intracelular que comprende el receptor de señalización o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en receptor de interleucina-2 (IL-2R), receptor de interleucina-12 (IL-12R), CD3, CD28, CD137, CD27, ICOS, OX40, y cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, el ácido nucleico comprende ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético. En otras realizaciones, el factor de activación es la citocina soluble seleccionada del grupo que consiste en IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TNF, TGF, IFN, y fragmentos funcionales y variantes de los mismos. En realizaciones adicionales, los linfocitos T se unen a un antígeno tumoral. En realizaciones adicionales, el antígeno tumoral es un antígeno asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y combinaciones de los mismos.

También se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para suministrar un factor a un sitio diana. El método comprende administrar una población de células a un sujeto que lo necesite, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente una molécula interruptor. La molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un IL-12R o un fragmento del mismo. La interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana.

También se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para suministrar un factor a un sitio diana. El método comprende administrar una población de células que comprende linfocitos T a un sujeto que lo necesita, en donde los linfocitos T se alojan en el sitio diana y expresan transitoriamente una molécula interruptor. La molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y un anticuerpo biespecífico que comprende la biespecificidad para un antígeno en una célula diana y un antígeno en un linfocito T activador y los linfocitos T se activan en el sitio diana, en donde se induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación. En una realización, la activación de los linfocitos T comprende unir un ligando al dominio extracelular de la molécula interruptor. En otra realización, la activación de los linfocitos T comprende unir el anticuerpo biespecífico al antígeno de linfocitos T activadores en los linfocitos T.

También se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para tratar una enfermedad o afección. El método comprende administrar una población de linfocitos T modificados a un sujeto donde los linfocitos T comprenden un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo. Los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana, tratando así la enfermedad o afección.

También se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una población de linfocitos T modificados que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y al menos uno de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión soluble y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y un antígeno en un linfocito T activador. Los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la proteína de fusión soluble y/o el anticuerpo biespecífico y la activación de los linfocitos T induce la secreción de un factor de

activación en el sitio diana, tratando así la enfermedad o afección. En determinadas realizaciones, la enfermedad o afección es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, la enfermedad o afección es una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED, por sus siglas en inglés), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS, por sus siglas en inglés), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP, por sus siglas en inglés), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, esprúe celíaco-dermatitis herpetiforme; síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS, por sus siglas en inglés), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD, por sus siglas en inglés), penfigoide cicatricial, enfermedad de las crioglobulinas, síndrome de crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Dego, dermatomiositis-juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, por sus siglas en inglés), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS, por sus siglas en inglés), también conocida como esclerosis sistémica (SS, por sus siglas en inglés)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, granulomatosis de Wegener y cualquier combinación de las mismas. En determinadas realizaciones, la administración de los linfocitos T comprende inducir la lisis de la célula o tejido diana.

Se incluye adicionalmente, pero no forma parte de la presente invención, un método para generar un linfocito T que expresa transitoriamente una molécula interruptor. El método comprende introducir un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor en una población de linfocitos T, en donde la molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo. Los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en un sitio diana, generando así el linfocito T.

Además, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para generar un linfocito T que expresa transitoriamente una molécula interruptor y un anticuerpo biespecífico. El método comprende introducir un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización, o un dominio extracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y al menos uno de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión soluble y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y un antígeno en un linfocito T activador. Los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la proteína de fusión soluble y/o el anticuerpo biespecífico y la activación de los linfocitos T induce la secreción de un factor de activación en un sitio diana. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se alojan en un sitio diana, en donde los linfocitos T secretan el factor de activación en el sitio diana. En otras realizaciones, la población de linfocitos T está comprendida en células seleccionadas del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T. En otras realizaciones, las células mononucleares de sangre periférica comprenden la población de linfocitos T. En realizaciones adicionales, los linfocitos T purificados comprenden la población de linfocitos T. En otras realizaciones, la población de linfocitos T se crioconserva y en determinados métodos divulgados en el presente documento, los linfocitos T crioconservados se descongelan.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

La figura 1 es una ilustración que muestra la construcción de moléculas interruptor, el cambio de receptores de TGF-beta a receptores de IL-12.

La figura 2 muestra una ilustración de las construcciones de ARN de moléculas interruptor de PD1 a 4-1BB que se sometieron a electroporación en linfocitos T.

La figura 3 es un panel de diagramas de flujo que muestra la expresión de la molécula interruptor de PD1 y la expresión de CAR en linfocitos T después de la electroporación conjunta de la molécula interruptor PD1-4-1BB y del ARN CD19 CAR en linfocitos T.

La figura 4 es un gráfico que muestra la secreción de IFN-gamma de linfocitos T estimulados con OKT3, sometidos a electroporación con ARN de la molécula interruptor TGF- β R-IL-12R. La señalización de IL-12 se indujo mediante electroporación de ARN de la molécula interruptor TGF β R-IL-12R en linfocitos T.

La figura 5 muestra la secreción de IFN-gamma de células NK estimuladas por K562. La señalización de IL-12 se indujo mediante electroporación del ARN de la molécula interruptor TGF β R-IL-12R en células NK.

La figura 6 es un gráfico que muestra el cambio de la activación de señal de TGF β a IL-12 mediante el aumento de pStat4 después de electroporar linfocitos T con la molécula interruptor TGF β R-IL-12R que contiene construcciones de ARN en presencia de TGF β .

La figura 7 es un gráfico que muestra el cambio de la señal de TGF β a CD28 (aTGF β RII-1412) y de TGF β a IL-12 (TGF β R-IL-12R) mediante el aumento de pSmad de linfocitos T estimulados con TGF β después de someter a electroporación a linfocitos T con construcciones de ARN de molécula interruptor. Como control se usó ARN para un receptor de TGF- β negativo dominante (DNTGF β).

La figura 8 es un panel de gráficos que muestra la señalización de TGF- β bloqueada por TGF β R-IL-12R de manera tan eficaz como TGF β RII dominante (DNTGF β R).

La figura 9 es un panel de gráficos que muestra la señalización de TGF- β bloqueada por scFv biespecífico TGF β R-CD28 (aTGF β RII-1-1412) de manera tan eficaz como TGF β RII dominante (DNTGF β R).

La figura 10 es un panel de gráficos que muestra una mayor resistencia a la supresión mediante Treg de linfocitos T que expresan una molécula interruptor TGF β R-CD28 (aTGF β R-1-1412).

La figura 11 es un panel de gráficos que muestra la expresión de Foxp3 en Tregs inducidos (iTregs).

La figura 12 es un panel de gráficos que muestra una producción de citocinas disminuida de iTregs (estimulación con PMA).

La figura 13 es un panel de gráficos que muestra la supresión de la proliferación de linfocitos T efectores (Tefect.) por iTregs.

La figura 14 es un panel de gráficos que muestra la inducción reducida de Treg para los linfocitos T que expresan bien aTGF β R-3-1412 o TGF β R-IL-12R como se evidencia por la disminución de la expresión de Foxp3.

La figura 15 es un panel de gráficos que muestra la función supresora reducida de Treg inducida a partir de linfocitos T que expresan bien aTGF β R-3-1412 o TGF β R-IL-12R como se evidencia por la disminución de la expresión de Foxp3.

La figura 16A es un panel de diagramas de flujo que muestra el aumento de la activación de linfocitos T y la capacidad de linfocitos T sometidos a electroporación con Bis-ARN para destruir tumores. Los linfocitos T se sometieron a electroporación con una cantidad diferente (μ g de ARN/0,1 ml de linfocitos T) de Bis-ARN de blinatumomab (Bis-ARN) o ARN CD19 CAR (ARN de CAR) como se indica. Dieciocho horas después de la electroporación, los linfocitos T con Bis-ARN o ARN de CAR se estimularon con líneas celulares CD19 positivas con o sin la adición de un número igual de linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de GFP (GFP-T) y se evaluó la expresión de CD107a.

La figura 16B es un panel de gráficos que muestra la expresión de IFN-gamma y Granzima B después de la electroporación de Bis-ARN. Dieciocho horas después de la electroporación de los linfocitos T descritos anteriormente, los linfocitos T sometidos a electroporación se sometieron a tinción intracelular de IFN-gamma y Granzima B (figura 2B).

La figura 16C es un gráfico que muestra la detección mediante ELISA de IFN-gamma. El ELISA para IFN-gamma se realizó después de una estimulación durante la noche de los linfocitos T con células CD19 positivas (Nalm6, K562-CD19 y Raji) o líneas celulares CD19 negativas (K562).

La figura 16D es un gráfico que muestra la especificidad de los linfocitos T después de la electroporación y la expresión de Bis-ARN. Los linfocitos T se sometieron a electroporación con Bis-ARN de Blinatumomab (Bis-ARN) o ARN CD19bbz CAR (ARN de CAR a dosis de ARN de 1, 5 o 10 μ g/0,1 ml de linfocitos T, o se sometieron a coelectroporación con 5 μ g de Bis-ARN y ARN de CAR (Bis-ARN + ARN de CAR). Dieciocho horas después de la electroporación, la

actividad lítica se evaluó con un ensayo de linfocitos T citotóxicos basado en un flujo de cuatro horas en las relaciones efector:diana indicadas.

La figura 17 es una tabla que enumera los ARN de proteínas de fusión solubles introducidos por electroporación en linfocitos T.

La figura 18 es una ilustración que muestra la construcción de anticuerpos biespecíficos utilizando scFv anti-PD-L1 y anti-CD28.

La figura 19A es un gráfico que muestra la producción de IL-2 por linfocitos T sometidos a electroporación con los diferentes ARN mostrados en las figuras 3 y 5 y activados por incubación con células tumorales.

La figura 19B es un gráfico que muestra la producción de IFN-gamma por linfocitos T sometidos a electroporación con los diferentes ARN mostrados en las figuras 3 y 5 y activados por incubación con células tumorales.

La figura 20 es una ilustración que muestra la construcción de anticuerpos biespecíficos utilizando scFv contra el receptor II de TGF β y anti-CD28.

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la invención.

Aunque en la práctica para el análisis de la presente invención también se puede usar cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen en el presente documento los materiales y métodos preferentes. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea una limitación.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ con respecto al valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

La expresión "factor de activación" se refiere a una molécula inmunomoduladora. El factor de activación puede unirse, activar o estimular los linfocitos T u otras células inmunitarias para modular su actividad. El factor de activación se encuentra además en una forma que es capaz de ser secretado por la célula, como si careciera de una región transmembrana. En algunas realizaciones, el factor de activación se selecciona de un anticuerpo, una citocina soluble, una quimiocina soluble, un factor de crecimiento o un fragmento funcional o variante de los mismos.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas procedentes de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser partes inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son normalmente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los tetrámeros pueden ser de origen natural o reconstruidos a partir de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos también incluyen dímeros que pueden existir de forma natural o construirse a partir de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en diversas formas incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab')₂, así como anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos (Harlow *et al.*, 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una región de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv, anticuerpos de un solo dominio, tal como anticuerpos de camélidos (Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38), compuestos por un dominio VL o VH que presenta suficiente afinidad por la diana y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. El fragmento de anticuerpo también incluye un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado o un fragmento de un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado del mismo.

Una "cadena pesada de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural.

Una "cadena ligera de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural. Las cadenas ligeras α y β se refieren a los dos isotipos principales de cadenas ligeras de anticuerpos.

Por la expresión "anticuerpo sintético", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado mediante un bacteriófago como se describe en el presente documento. La expresión también debe interpretarse como un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y que la molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido usando tecnología de ADN sintético o de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

El término "antígeno" o "Ag", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunitariamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia comprenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede actuar como antígeno. Asimismo, los antígenos pueden generarse a partir de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia comprenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, por lo tanto, codifica un "antígeno" como se usa ese término en el presente documento. Asimismo, un experto en la materia comprenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Resulta evidente que la presente invención incluye, pero sin limitación, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos se disponen en diversas combinaciones para provocar la respuesta inmunitaria deseada. Por otra parte, un experto en la materia comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que se puede generar, sintetizar u originar un antígeno a partir de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero sin limitación, una muestra tisular, una muestra tumoral, una célula o un fluido biológico.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "autólogo" se refiere a cualquier material procedente del mismo individuo al que luego se va a reintroducir en el individuo.

"Alogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal diferente de la misma especie.

"Xenogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

Un "anticuerpo biespecífico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos antígenicos diferentes. En una realización, los epítopos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítopos son de dos antígenos diferentes. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden producir de forma recombinante usando la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Milstein *et al.* (1983) *Nature* 305: 537-39. Como alternativa, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Véase, por ejemplo, Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Véanse, por ejemplo, Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48, Gruber *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:5368.

"Biespecificidad", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. En una realización, los epítopos son del mismo compañero de unión. En otra realización, los epítopos son de dos compañeros de unión diferentes. La molécula con biespecificidad para diferentes epítopos puede incluir un anticuerpo biespecífico.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del organismo. Los ejemplos de diversos cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides y similares.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "modificaciones de secuencia conservativas" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo mediante técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Son sustituciones conservativas de aminoácidos aquellas en las que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de

aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, se pueden reemplazar uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo por otros restos de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede analizarse para determinar la capacidad unión al antígeno usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

El "ligando coestimulador" como se usa la expresión en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígenos (p. ej., una aAPC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimulante afín en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, que incluye, pero sin limitación, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulante puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulante inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulante también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimulante presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo una respuesta coestimulante mediante el linfocito T, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

La expresión "procedente de" se refiere a que se genera, sintetiza o se origina a partir de una fuente particular, de manera que la materia derivada está relacionada con la fuente. La materia derivada no necesita ser idéntica a la fuente particular. En una realización, un antígeno procede de una proteína. En otra realización, un fragmento variable monocatenario procede de un anticuerpo monoclonal.

Los términos "electroporar", "electroporación", "sometido a electroporación" se refiere al proceso mediante el cual se aplica un campo eléctrico a la membrana plasmática de una célula para aumentar su permeabilidad. Se aplica un pulso de una duración y forma específicas a la membrana celular de una célula para introducir ácidos nucleicos en la célula.

"Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, tal como se describe en el presente documento como eficaz para lograr un resultado biológico particular. Dichos resultados pueden incluir, pero sin limitación, la inhibición de la infección por virus determinada por cualquier medio adecuado en la técnica.

"Codificante" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y, habitualmente, se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, usada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, se pueden denominar codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Como se usa en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

Como se usa en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

La expresión "dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo" se refiere al fragmento o porción de un receptor de membrana en el exterior de la célula. El dominio extracelular que comprende el receptor de membrana o un fragmento del mismo incluye el dominio de unión o reconocimiento del ligando. El dominio extracelular puede o no incluir un dominio transmembrana del receptor de membrana.

Como se usa en el presente documento, los términos "expandir", y "expansión" se refieren a la proliferación o multiplicación de células, tales como linfocitos T.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción en *cis* para la expresión; pueden suministrarse otros elementos para la expresión por la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (p. ej., desnudos o contenidos en liposomas) y virus (p. ej., entivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

"Homólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, p. ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, tal como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; p. ej., si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50 % homólogas; si el 90 % de las posiciones (p. ej., 9 de 10) son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 90 % homólogas.

"Identidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, particularmente entre dos moléculas de aminoácidos, tal como, entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos restos en las mismas posiciones; p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas polipeptídicas está ocupada por una arginina, entonces son idénticas en esa posición. La identidad o el grado en el que dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos restos en las mismas posiciones en un alineamiento se expresa con frecuencia como un porcentaje. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos es una función directa del número de posiciones coincidentes o idénticas; p. ej., si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son idénticas, las dos secuencias son idénticas al 50 %; si el 90 % de las posiciones (p. ej., 9 de 10) son coincidentes o idénticas, las dos secuencias de aminoácidos son idénticas en un 90 %.

Las expresiones "una cantidad inmunitariamente eficaz", "una cantidad de respuesta antiinmunitaria eficaz", "una cantidad que inhibe la respuesta inmunitaria eficaz" o "cantidad terapéutica" se refiere a la cantidad de la composición de la presente invención que se administrará a un sujeto, cuya cantidad está determinada por un médico, opcionalmente en consulta con un científico, teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, respuesta inmunitaria, tipo de enfermedad/afección, y la salud del sujeto (paciente) para que se obtenga el resultado deseado en el sujeto.

La expresión "dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo" se refiere al fragmento o porción de un receptor de activación en el interior de la célula que es responsable de la activación de al menos una función efectora. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citocinas. Por lo tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula a realizar una función especializada. El dominio intracelular que comprende el receptor de señalización o fragmento del mismo puede incluir el dominio de señalización, dominio de interacción de proteínas, dominio enzimático o una combinación de los mismos. Si bien, habitualmente, se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar toda la cadena. En la medida en que se use una parte truncada del dominio de señalización intracelular, dicha parte truncada se puede usar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de función efectora. Por tanto, se entiende que la expresión dominio de señalización intracelular incluye cualquier parte truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora. El dominio intracelular puede o no incluir un dominio transmembrana del receptor de activación.

Como se usa en el presente documento, un "material de formación" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de formación del kit puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material de formación puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material de formación y el compuesto sean utilizados conjuntamente por el receptor.

"Aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislados pueden existir

en forma sustancialmente purificada o pueden existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

La expresión "receptor de membrana" se refiere a cualquier receptor que se encuentre en la superficie de un linfocito T o una célula NK. El receptor de membrana puede incluir receptores para hormonas, citocinas, factores de crecimiento, moléculas de reconocimiento celular u otros receptores de señalización. Los ejemplos ilustrativos de receptores de membrana incluyen, pero sin limitación, receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R), muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL1), receptor de interferón-gamma (IFN-gamma), receptor de interleucina-2 (IL-2R), receptor de interleucina-12 (IL-12R), CD3, CD4, CD8, CD28 y CD137.

Por el término "modificado", tal como se usa en el presente documento, se entiende un estado o estructura cambiados de una molécula o célula de la invención. Las moléculas pueden modificarse de muchas maneras, incluso química, estructural y funcionalmente. Las células pueden modificarse mediante la introducción de ácidos nucleicos.

Por el término "modulación", como se usa en el presente documento, se entiende la mediación de un aumento o disminución detectables en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero sin tratar. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta natural, por lo tanto, la mediación de una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente, un ser humano.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos habituales. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a la citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

A menos que se especifique de otro modo, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La expresión secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener, en alguna versión, uno o más intrones.

La expresión "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente están contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, p. ej., inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, o técnicas de infusión.

El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se define como una cadena de nucleótidos. Asimismo, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por tanto, ácidos nucleicos y polinucleótidos, como se usan en el presente documento, son intercambiables. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usan en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la técnica, que incluye, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, usando de tecnología de clonación habitual y PCR™, y similares, y mediante medios sintéticos.

Como se usa en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto comprendido por restos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan habitualmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, que se denominan en general en la técnica proteínas, de las que existen muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

El término "promotor", como se usa en el presente documento, se define como una secuencia de ADN reconocida por

la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia polinucleotídica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y, en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula en la mayoría o la totalidad de las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo tisular correspondiente al promotor.

Una "vía de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señales que desempeñan una función en la transmisión de una señal de una región de una célula a otra región de una célula. La expresión "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitirla a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" es CD3 o CD28 humanos.

La expresión "receptor de señalización", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor de membrana que interactúa con un ligando para desencadenar una cadena bioquímica de eventos dentro de la célula, creando una respuesta, tales como la transducción de señales, interacción de proteínas, actividad enzimática, o una combinación de las mismas. Los ejemplos ilustrativos de receptores de señalización incluyen, entre otros, el receptor de interleucina-2 (IL-2R), el receptor de interleucina-12 (IL-12R), CD3, CD28 y CD137.

La expresión "proteína de fusión soluble" como se usa en el presente documento se refiere a una fusión que tiene dos dominios de unión diferentes con especificidades de unión diferentes. La proteína de fusión soluble es capaz de unirse a dos ligandos, receptores, antígenos o moléculas diferentes. En una realización ilustrativa, la proteína de fusión soluble incluye un dominio de unión con especificidad para unirse a al menos una molécula en un linfocito T activador y un segundo dominio de unión con especificidad para unirse a al menos una molécula en una célula diana.

Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une con una proteína compañera de unión afín (p. ej., una molécula estimulante y/o coestimulante presente en un linfocito T) presente en una muestra, pero dicho anticuerpo o ligando no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de la muestra.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimulante (p. ej., un complejo TCR/CD3) con su ligando afín mediando de este modo en un acontecimiento de transducción de señal, tal como, pero sin limitación, transducción de señal a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de determinadas moléculas, tal como la regulación negativa de TGF- β , y/o la reorganización de estructuras citoesqueléticas, y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa la expresión en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulante afín presente en una célula presentadora de antígenos.

Un "ligando estimulador", como se usa en el presente documento, significa un ligando que, cuando está presente en una célula presentadora de antígenos (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) se puede unir específicamente con un compañero de unión afín (denominado en el presente documento "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando de este modo en una respuesta primaria por el linfocito T, que incluye, pero sin limitación, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimulantes son bien conocidos en la técnica y abarcan, entre otros, una molécula del MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.

Se entiende que el término "sujeto" incluye organismos vivos en los que se puede inducir una respuesta inmunitaria (p. ej., mamíferos). Un "sujeto" o "paciente", como se usa en el mismo, puede ser un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y mascotas, tales como mamíferos ovinos, bovinos,

porcinos, cánidos, felinos y murinos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos celulares con los que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a células que se han separado de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.

La expresión "molécula interruptor" se refiere a un receptor modificado por ingeniería que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo. Cuando la molécula interruptor se expresa en una célula, tal como un linfocito T o célula NK, la interacción con el dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando activa el dominio intracelular que comprende el receptor de señalización o fragmento del mismo. El dominio intracelular transmite señales dentro de la célula que son específicas del receptor de señalización, tales como la transducción de señales del receptor de señalización, activación de moléculas efectoras, secreción de un factor de activación, o cualquier combinación de los mismos.

Un "sitio diana" o "secuencia diana" se refiere a una secuencia de ácido nucleico genómico que define una región de un ácido nucleico a la que una molécula de unión puede unirse de manera específica en condiciones suficientes para que se produzca la unión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de linfocitos T" o "TCR" se refiere a un complejo de proteínas de membrana que participan en la activación de linfocitos T en respuesta a la presentación del antígeno. El TCR es responsable de reconocer antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El TCR está compuesto por un heterodímero de una cadena alfa (α) y beta (β), aunque en algunas células el TCR consiste en cadenas gamma y delta (γ/δ). Los TCR pueden existir en formas alfa/beta y gamma/delta, que son estructuralmente similares pero tienen ubicaciones y funciones anatómicas distintas. Cada cadena está compuesta por dos dominios extracelulares, un dominio variable y uno constante. En algunas realizaciones, el TCR puede modificarse en cualquier célula que comprenda un TCR, que incluye, por ejemplo, un linfocito T auxiliar, un linfocito T citotóxico, un linfocito T de memoria, un linfocito T regulador, linfocito T citolítico y linfocito T gamma delta.

El término "terapéutico", como se usa en el presente documento, significa un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de una patología.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula objeto principal y su descendencia.

La expresión "antígeno tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno que es común a tumores o trastornos hiperproliferativos específicos. En algunos aspectos, el antígeno tumoral puede proceder de, un cáncer que incluye, entre otros, melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no hodgkiniano, linfoma no hodgkiniano, leucemias, cáncer de útero, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares.

La expresión "bajo control transcripcional" o "unido operativamente", como se usa en el presente documento, significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede usar para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. En la técnica se conocen numerosos vectores, que incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plasmídicos y no víricos que faciliten la transferencia de ácido nucleico a las células, tal como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y similares.

Intervalos: a lo largo de la presente divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos divulgados específicamente tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese

intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

5 Los linfocitos T pueden ser un vehículo de suministro ideal cuando se utiliza la nueva tecnología de electroporación de ARN de linfocitos T. El suministro dirigido de fármacos administrados de forma exógena es una limitación de las terapias actuales. Los linfocitos T sometidos a electroporación con ARN descritos en el presente documento pueden superar potencialmente esta limitación de usar fármacos administrados de forma exógena para suministrar moléculas que organizan actividades antitumorales en microambientes tumorales a un sitio diana.

10 Las limitaciones del uso de la transducción vírica de linfocitos T también se pueden superar, mediante electroporación con ARN de linfocitos T. A diferencia de la transducción vírica de linfocitos T, la electroporación con ARN es una modificación sin vectores transitoria, del linfocito T. Por otra parte, la integración del ARN en el genoma de la célula hospedadora es improbable. Los linfocitos T se pueden someter a electroporación con moléculas codificantes de ARN que inician la destrucción específica con linfocitos T de las células tumorales diana y potencian las actividades antitumorales de los linfocitos T, tal como moléculas interruptor para convertir señales negativas de linfocitos T, como PD1 o TGF-beta, a señales positivas, como CD28.

20 La presente invención incluye la modificación de linfocitos T para que actúen como vehículos de suministro para expresar y secretar transitoriamente un factor en un sitio diana. En una realización, un método para suministrar un factor a un sitio diana incluye la electroporación de una población de células que comprende linfocitos T con ARNm que codifica una molécula interruptor, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la molécula interruptor induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana.

25 Al electroporar y administrar los linfocitos T según la invención descrita, los linfocitos T pueden alojarse en el sitio diana. Los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y secretan un factor de activación en el sitio diana. En consecuencia, la presente invención facilita la expresión de moléculas interruptor y el suministro de factores de activación al sitio diana para modular la actividad inmunitaria.

30 Moléculas interruptor

La presente invención incluye un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico sometido a electroporación que codifica una molécula interruptor. En un aspecto, la invención incluye un método para generar un linfocito T que expresa transitoriamente una molécula interruptor. La molécula interruptor generalmente se compone de un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo o un dominio extracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo.

40 Cuando un ácido nucleico que codifica la molécula interruptor se expresa en una célula, tal como un linfocito T o célula NK, la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando activa el dominio intracelular que comprende la molécula interruptor o fragmento de la misma. El dominio intracelular transmite señales dentro de la célula que son específicas del dominio intracelular, tales como la transducción de señales del receptor de señalización, activación de moléculas efectoras, secreción de un factor de activación, o cualquier combinación de los mismos.

45 En un aspecto, la invención incluye un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico sometido a electroporación que codifica una molécula interruptor. La molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización o un dominio extracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo. El linfocito T expresa transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce al linfocito T a secretar un factor de activación en un sitio diana.

55 Dominio extracelular

El dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo puede incluir el dominio de unión a ligando o el dominio de reconocimiento de ligando. En una realización, el dominio extracelular que comprende el receptor de membrana o un fragmento del mismo es un fragmento o un dominio de un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R), muerte celular programada 1 (PD1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL1), receptor de interferón-gamma (IFN-gamma), o cualquier combinación de los mismos.

En un aspecto, la molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) o un fragmento del mismo.

65 Dominio intracelular

- El dominio intracelular comprende una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a un dominio intracelular o fragmento del mismo de un receptor de señalización. Un receptor de señalización incluye, pero sin limitación, una molécula coestimuladora o molécula de superficie celular que es necesaria para una activación eficiente de un linfocito. En otra realización, el dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo incluye un fragmento o dominio de un receptor de activación. El dominio intracelular que comprende el receptor de señalización o fragmento del mismo puede incluir un dominio de señalización, un dominio de interacción de proteínas, un dominio enzimático o cualquier combinación de los mismos. En otra realización más, el dominio intracelular que comprende el receptor de señalización o fragmento del mismo incluye cualquier fragmento o dominio de un dominio intracelular del receptor de interleucina-2 (IL-2R), receptor de interleucina-12 (IL-12R), CD3, CD28, CD137, CD27, ICOS, OX40, receptor de linfocitos T (TCR), moléculas coestimuladoras, cualquier derivado o variante de estas secuencias, cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional y cualquier combinación de los mismos.
- En un aspecto, la molécula interruptor comprende un dominio intracelular que comprende un IL-12R o un fragmento del mismo.

Otros dominios

- En algunas realizaciones, la molécula interruptor comprende además un dominio transmembrana. En alguna realización, la molécula interruptor comprende además un dominio bisagra. En una realización, un ácido nucleico que codifica la molécula interruptor comprende además un ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana y un ácido nucleico que codifica un dominio bisagra, tal como un ácido nucleico que codifica un dominio transmembrana de CD28 y un ácido nucleico que codifica un dominio bisagra de CD8-alfa. El dominio extracelular y/o el dominio intracelular también pueden incluir un dominio transmembrana de la misma molécula receptora del dominio extracelular o del dominio intracelular.

- Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana de la molécula interruptor, o entre el dominio intracelular y el dominio transmembrana de la molécula interruptor, puede existir un dominio espaciador. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que sirve para unir el dominio transmembrana a, tanto el dominio extracelular como, al dominio intracelular en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y lo más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

Anticuerpos biespecíficos

- También se incluye, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico comprende dos especificidades de unión diferentes y, por lo tanto, se une a dos antígenos diferentes. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une a un primer antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a un segundo antígeno. En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende un dominio de unión a antígeno que comprende una primera y una segunda moléculas de fragmento variable monocatenario (scFv). En una realización, los dominios de unión a antígeno primero y segundo se unen a un antígeno en una célula diana y a un antígeno en un linfocito T activador.
- En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende especificidad para al menos un antígeno en un linfocito T activador. El antígeno de linfocito T activador incluye antígenos que se encuentran en la superficie de un linfocito T que puede activar otra célula. El antígeno de linfocito T activador puede unirse a una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular, diferente a un receptor de antígeno o sus ligandos, que se necesita para una respuesta eficaz de los linfocitos a un antígeno. Los ejemplos del antígeno de linfocito T activador pueden incluir, entre otros, CD3, CD4, CD8, receptor de linfocitos T (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 o cualquier fragmento de los mismos. Otros elementos coestimuladores también están dentro del alcance de la divulgación, pero no son parte de la invención.
- En estos ejemplos, el anticuerpo biespecífico reconoce un antígeno de linfocitos T y se denomina acoplador biespecífico de linfocitos T (Bispecific T Cell Engager, BiTE). Sin embargo, la presente divulgación no está limitada por el uso de ningún anticuerpo biespecífico en particular. Más bien, puede usarse cualquier anticuerpo biespecífico o BiTE. El anticuerpo biespecífico o molécula BiTE también puede expresarse como una proteína soluble con especificidad por al menos un antígeno asociado a células diana.
- En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende más de un dominio de unión a antígeno. En esta realización, al menos un dominio de unión a antígeno incluye un anticuerpo sintético, anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, fragmento variable monocatenario, anticuerpo de dominio único, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos. Las técnicas para producir anticuerpos humanos y humanizados se describen en otra parte del presente documento.

En otra realización, el antígeno de la célula diana puede ser el mismo antígeno al que se une un receptor de linfocitos T o puede ser un antígeno diferente. El antígeno de la célula diana incluye cualquier antígeno asociado a tumores (TAA) o antígeno vírico, bacteriano y parasitario, o cualquier fragmento del mismo. El antígeno de la célula diana puede incluir cualquier tipo de ligando que defina la célula diana. Por ejemplo, el antígeno de la célula diana puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador celular en células diana asociadas con una patología determinada. Por tanto, los marcadores celulares pueden actuar como ligandos para el dominio de unión a antígeno en el anticuerpo biespecífico, incluyendo aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

En otra realización, el antígeno de la célula diana es el mismo antígeno que el antígeno del linfocito T activador que incluye, pero sin limitación, CD3, CD4, CD8, receptor de linfocitos T (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 y fragmentos de los mismos. En un aspecto, la invención incluye un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y para un antígeno en un linfocito T activador, en donde el linfocito T secreta transitoriamente el anticuerpo biespecífico. Las técnicas para modificar por ingeniería y expresar anticuerpos biespecíficos incluyen, pero sin limitación, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véanse Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), e ingeniería de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168). También pueden producirse anticuerpos multiespecíficos modificando por ingeniería efectos de direccionamiento electrostático para producir moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)); utilizando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpo" para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y utilizando dímeros de Fv monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos, como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991). Los anticuerpos modificados por ingeniería con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, que incluyen "anticuerpos Octopus", también se incluyen en el presente documento, (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1). Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir uniendo dos anticuerpos diferentes o porciones de los mismos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede comprender Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y sdAb de dos anticuerpos diferentes.

Proteínas de fusión solubles

Se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un linfocito T modificado para expresar una proteína de fusión soluble con o sin la molécula interruptor. Una proteína de fusión soluble comprende dos especificidades de unión diferentes y, por lo tanto, se une a dos ligandos o receptores o antígenos o moléculas diferentes. En una realización, la proteína de fusión soluble comprende un primer dominio de unión que se une a un primer ligando, receptor, antígeno o fragmento de los mismos y un segundo dominio de unión que se une a un segundo ligando, receptor, antígeno o fragmento de los mismos. En otra realización, la proteína de fusión soluble comprende un primer dominio de unión que comprende una primera molécula de fragmento variable monocatenario (scFv) y un segundo dominio de unión que comprende una segunda molécula de fragmento variable monocatenario (scFv). En una realización, los dominios de unión primero y segundo se unen a un receptor en una célula diana y a un receptor en un linfocito T activador, respectivamente.

En una realización, la proteína de fusión soluble comprende al menos un dominio de unión con especificidad para unirse a al menos una molécula en un linfocito T activador. La molécula de linfocito T activador incluye cualquier molécula de superficie que se encuentre en un linfocito T. La molécula de linfocito T activador puede unirse a una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular que es necesaria para una respuesta eficaz de los linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de la molécula de linfocitos T activadores pueden incluir, entre otros, CD3, CD4, CD8, receptor de linfocitos T (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 o cualquier fragmento de los mismos. Otros elementos coestimuladores también están dentro del alcance de la divulgación. Sin embargo, la presente divulgación no está limitada por el uso de anticuerpos. Más bien, puede utilizarse cualquier ligando, receptor, antígeno o fragmento de los mismos como parte de la proteína de fusión soluble. En una realización, la proteína de fusión soluble comprende al menos un dominio de unión con especificidad para unirse a CD28, tal como, pero sin limitación, a un ligando, un anticuerpo o un fragmento de los mismos. En una realización particular, la proteína de fusión soluble comprende un dominio de unión que comprende un scFv anti-CD28.

En una realización, la proteína de fusión soluble comprende al menos un dominio de unión que comprende un anticuerpo sintético, anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, fragmento variable monocatenario, anticuerpo de dominio único, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos. Las técnicas para producir anticuerpos humanos y humanizados se describen en otra parte del presente documento.

En otra realización, la proteína de fusión soluble comprende al menos un dominio de unión con especificidad para unirse a cualquier antígeno asociado a tumores (TAA) o antígeno vírico, bacteriano y parasitario, o cualquier fragmento de los mismos. El dominio de unión tiene especificidad para unirse a cualquier tipo de ligando que define una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión puede unirse específicamente a una molécula en una célula diana elegida para reconocer la célula diana como asociada con una patología en particular. En una realización, la proteína de fusión soluble comprende al menos un dominio de unión con especificidad para unirse a TGFβRII, tal como, pero sin limitación, a un ligando, un anticuerpo o un fragmento de los mismos. En una realización particular, la proteína de fusión soluble comprende un segundo dominio de unión que comprende un scFv anti-TGFβRII. En otra realización, la proteína de fusión soluble comprende al menos un dominio de unión con especificidad para unirse a PD-L1, tal como, pero sin limitación, a un ligando, un anticuerpo o un fragmento de los mismos. En una realización particular, la proteína de fusión soluble comprende un dominio de unión que comprende un scFv anti-PD-L1.

En otra realización, la proteína de fusión soluble comprende al menos un dominio de unión con especificidad para unirse al menos a una molécula en un antígeno de célula diana.

El dominio de unión puede unirse a la misma molécula en el linfocito T activador, que incluye, pero sin limitación, CD3, CD4, CD8, receptor de linfocitos T (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 y fragmentos de los mismos.

La proteína de fusión soluble puede incluir además un dominio espaciador entre los dominios de unión. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que sirve para unir el primer y el segundo dominios de unión en una cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 100 aminoácidos, preferentemente de 2 a 50 aminoácidos y lo más preferentemente de 5 a 10 aminoácidos.

Anticuerpos humanos

Para el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, puede ser preferible usar anticuerpos humanos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de presentación en fagos usando bibliotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulina humana, incluyendo mejoras de estas técnicas. Véanse, también, las patentes de los Estados Unidos n.º 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Un anticuerpo humano también puede ser un anticuerpo en donde las cadenas pesadas y ligeras están codificadas por una secuencia de nucleótidos procedente de una o más fuentes de ADN humano.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable, la región constante y la región de diversidad humanas pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanas. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de locus de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían después para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una parte de un polipéptido de la divulgación que no forma parte de la invención. Los anticuerpos dirigidos contra la diana de elección se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados, usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de los linfocitos B y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles, entre los que se incluyen, pero sin limitación, IgG1 (gamma 1) e IgG3. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase, Lonberg y Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT con números WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y las patentes de los Estados Unidos n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; y 5.939.598. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, California) y Genpharm (San José, California) pueden participar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente. Para un análisis específico de la transferencia de una matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en ratones mutantes de línea germinal que dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno, véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year

in Immunol., 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, Nature, 355:258 (1992).

Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan *et al.*, Nature Biotech., 14:309 (1996)). La tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína mayor o menor de la envoltura de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos antioxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V procedentes de los bazo de ratones sin inmunizar. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) o Griffith *et al.*, EMBO J., 12:725-734 (1993). Véanse, también, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.565.332 y 5.573.905.

También pueden generarse anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.567.610 y 5.229.275). También pueden generarse anticuerpos humanos *in vitro* usando técnicas de hibridoma tales como, pero sin limitación, las descritas por Roder *et al.* (Methods Enzymol., 121:140-167 (1986)).

Anticuerpos humanizados

Como alternativa, en algunas realizaciones, se humaniza un anticuerpo no humano, donde se modifican secuencias o regiones específicas del anticuerpo para aumentar la similitud con un anticuerpo producido de forma natural en un ser humano. En una realización, se humaniza el dominio de unión a antígeno.

Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, usando determinados métodos de humanización, la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo para el antígeno humano puede aumentarse usando métodos de "evolución dirigida", como se describe en Wu *et al.*, J. Mol. Biol., 294:151 (1 999).

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". Por tanto, los anticuerpos humanizados comprenden una o más CDR de moléculas de inmunoglobulina no humanas y regiones marco conservadas de seres humanos. La humanización de anticuerpos es bien conocida en la técnica y esencialmente se puede realizar siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación del PCT n.º WO 91/09967; y las patentes de los Estados Unidos n.º 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640).

En dichos anticuerpos quiméricos humanizados, se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización de anticuerpos también se puede lograr mediante chapado o modificación de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28 (4/5): 489-498; Studnicka *et al.*, Protein Engineering, 7 (6): 805-814 (1994); y Roguska *et al.*, PNAS, 91:969-973 (1994)) o reordenamiento de cadenas (patente de los Estados Unidos n.º 5.565.332).

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es para reducir la antigenicidad. Según el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como el marco conservado (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro método usa un marco conservado determinado procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo determinado de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Los anticuerpos se pueden humanizar con conservación de alta afinidad por el antígeno diana y otras propiedades biológicas favorables. Según un aspecto de la divulgación que no forma parte de la invención, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están habitualmente disponibles y son conocidos para los expertos en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite un análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno diana. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir del receptor e importar secuencias, de tal forma que se logra la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno diana. En general, los restos de CDR están implicados directa y más sustancialmente en la influencia sobre la unión al antígeno.

15 Molécula coestimuladora

En una realización, el linfocito T modificado de la invención incluye además la introducción de un ácido nucleico que codifica una molécula coestimuladora, tal como un ácido nucleico sometido a electroporación que codifica la molécula coestimuladora en el linfocito T modificado. El ácido nucleico puede introducirse en el linfocito T mediante transducción, transfección o electroporación. En otra realización, el dominio coestimulador se selecciona de CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L. En otra realización más, el CD3 comprende al menos dos cadenas de CD3 diferentes, tal como las cadenas CD3 zeta y CD3 épsilon. En una realización ilustrativa, el ARN que codifica la molécula coestimuladora, tal como CD3, se introduce por electroporación en el linfocito T. En otra realización, el ácido nucleico que codifica la molécula coestimuladora, tal como el ARN de CD3, se introduce por electroporación junto con otro ácido nucleico, tal como el ácido nucleico o el ARN que codifica la molécula interruptor.

Factor de activación

Se incluye, pero no forma parte de la invención, un factor de activación, tal como una molécula inmunomoduladora. En un aspecto, la interacción de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce al linfocito T a secretar un factor de activación. El factor de activación puede unirse, activar o estimular los linfocitos T u otras células inmunitarias y modular su actividad. El factor de activación se encuentra también en una forma que es capaz de ser secretado por el linfocito T, careciendo dicho factor de activación de una región transmembrana. En algunas realizaciones, el factor de activación se selecciona de un anticuerpo, una citocina soluble, una quimiocina soluble, un factor de crecimiento o un fragmento funcional o variante de los mismos. En aquellas realizaciones donde el factor de activación es una citocina soluble, la citocina soluble puede ser, sin limitación, cualquiera de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TNF, TGF, IFN, y fragmentos funcionales y variantes de los mismos. Cuando el factor de activación es un anticuerpo o un fragmento funcional o una variante del mismo, el anticuerpo o el fragmento funcional o variante del mismo puede unirse de manera agonista o antagonista a un receptor en otro linfocito T o en una célula diana.

La secreción del factor de activación en el sitio diana puede promover la activación de otras células inmunitarias en el sitio diana. Por ejemplo, la secreción de interferón-gamma por parte del linfocito T que expresa la molécula interruptor activa los macrófagos y las células NK, al tiempo que proporciona importantes efectos inmunoestimuladores e inmunomoduladores a los linfocitos T.

Linfocitos T y composiciones de los mismos

Un aspecto de la invención incluye un linfocito T que comprende un ARNm sometido a electroporación que codifica una molécula interruptor, en donde el linfocito T expresa transitoriamente la molécula interruptor, en donde el linfocito T expresa transitoriamente la molécula interruptor y la interacción de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce al linfocito T a secretar un factor de activación en un sitio diana.

Se incluyen, pero no forman parte de la invención, linfocitos T modificados con moléculas interruptor, proteínas de fusión solubles y anticuerpos biespecíficos. En un aspecto, la invención incluye un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo, y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo; y al menos uno de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión soluble y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y un antígeno en un linfocito T activador, en donde el linfocito T expresa transitoriamente la molécula interruptor y secreta la proteína de fusión soluble o el anticuerpo biespecífico.

En otro aspecto, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, una población de linfocitos T modificados que comprenden un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor y al menos uno de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión soluble y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y secretan la proteína de fusión soluble o el anticuerpo

biespecífico.

En una realización, el linfocito T modificado se activa mediante la unión de la molécula interruptor a un ligando y la activación induce al linfocito T a secretar un factor de activación en un sitio diana. En otra realización, el linfocito T modificado se activa al unirse al anticuerpo biespecífico y la activación induce al linfocito T a secretar un factor de activación en un sitio diana.

El sitio diana puede incluir un tumor, tal como un tumor sólido. En una realización, el linfocito T se aloja en un tumor sólido. Ejemplos de tumores incluyen cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero, cáncer de tiroides y combinaciones de los mismos.

El linfocito T puede albergar un antígeno específico. Por ejemplo, el linfocito T puede albergar un antígeno tumoral. En una realización, el linfocito T puede unirse a un antígeno tumoral. El antígeno tumoral puede ser un antígeno asociado a tumores (TAA), un antígeno vírico, un antígeno reconocido por anticuerpos, cualquier fragmento de los mismos o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el antígeno tumoral puede ser p53, Ras, beta-catenina, CDK4, alfa-actinina-4, tirosinasa, TRP1/gp75, TRP2, gp100, Melan-A/MART1, gangliósidos, PSMA, HER2, WT1, EphA3, EGFR, CD20, MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, telomerasa, survivina o cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto, la invención incluye una población de linfocitos T modificados que comprende un ácido nucleico sometido a electroporación que codifica una molécula interruptor, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en un sitio diana. Otro aspecto de la invención incluye un método para generar un linfocito T que expresa transitoriamente una molécula interruptor. El método incluye la introducción de un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor en una población de linfocitos T, en donde la molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo, y en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su ligando correspondiente induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en un sitio diana, generando así el linfocito T. En una realización, el método incluye además activar los linfocitos T para que se dirijan a un sitio diana, en donde los linfocitos T secretan el factor de activación en el sitio diana.

En otro aspecto más, se incluye, pero no forma parte de la invención, un método para generar un linfocito T que expresa transitoriamente una molécula interruptor y una proteína de fusión soluble o un anticuerpo biespecífico. El método incluye la introducción de un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y al menos uno de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión soluble y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y para un antígeno en un linfocito T activador. En un aspecto, los linfocitos T pueden expresar transitoriamente la molécula interruptor y la proteína de fusión soluble o el anticuerpo biespecífico y la activación de los linfocitos T induce la secreción de un factor de activación en un sitio diana.

Fuentes de linfocitos T

Antes de la introducción del ácido nucleico que codifica la molécula interruptor, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Se pueden obtener linfocitos T de varias fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, tejido de bazo, cordón umbilical y tumores. En una realización, la fuente de los linfocitos T son células mononucleares de sangre periférica. En otra realización, la población de células comprende linfocitos T purificados.

En determinadas realizaciones, se pueden obtener linfocitos T de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquiera de varias técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como la separación de Ficoll. En una realización, las células de la sangre en circulación de un individuo se obtienen por aféresis o leucaféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. Las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes, para etapas de procesamiento posteriores. Tras el lavado, las células se pueden resuspender en diversos tampones biocompatibles, tal como, por ejemplo, PBS sin calcio, sin magnesio. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y las células se pueden

resuspender directamente en medios de cultivo.

En otra realización, los linfocitos T se aíslan de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Como alternativa, los linfocitos T se pueden aislar del cordón umbilical. En cualquier caso, una subpoblación específica de linfocitos T se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positivas o negativas.

Las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical o cualquier otra fuente de células que comprenden linfocitos T pueden carecer de células que no son linfocitos T que expresen determinados antígenos, que incluyen, pero sin limitación, CD34, CD8, CD14, CD19 y CD56. El agotamiento de estas células se puede lograr usando un anticuerpo aislado, una muestra biológica que comprende un anticuerpo, tal como ascitis, un anticuerpo unido a un soporte físico y un anticuerpo unido a una célula.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T por selección negativa se puede lograr usando una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método preferido es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ por selección negativa, una mezcla de anticuerpos monoclonales incluye normalmente anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y superficie (p. ej., partículas tales como perlas) puede variar. En determinadas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, en una realización, se usa una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una realización, se usa una concentración de 1 mil millones de células/ml. En una realización adicional, se usan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar lugar a un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular.

Los linfocitos T también se pueden congelar después de la etapa de lavado, que no requiere la etapa de eliminación de monocitos. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células se pueden suspender en una solución de congelación. Aunque muchas soluciones y parámetros de congelación se conocen en la técnica y serán útiles en este contexto, en un ejemplo no limitante, un método implica el uso de PBS que contiene DMSO al 20 % y albúmina de suero humano al 8 %, u otros medios de congelación celular adecuados. Luego, las células se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden usar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

En una realización, la población de células puede incluir células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T. En otra realización, la población de células comprende células mononucleares de sangre periférica. En otra realización más, la población de células comprende linfocitos T purificados.

Introducción de ácidos nucleicos

Los métodos para introducir ácidos nucleicos en una célula incluyen métodos físicos, biológicos y químicos. Los métodos físicos para introducir un polinucleótido, tal como ARN, en una célula hospedadora incluyen la precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. El ARN se puede introducir en las células diana utilizando métodos disponibles comercialmente que incluyen electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El ARN también se puede introducir en las células usando transfección mediada por liposomas catiónicos usando lipofección, usando encapsulación de polímeros, usando transfección mediada por péptidos, o usando sistemas de suministro de partículas biolísticas tales como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, *et al.* Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001).

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos, y especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el método más ampliamente usado para insertar genes en mamíferos, por ejemplo, en células humanas. Otros vectores víricos pueden proceder de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5,350,674 y 5,585,362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ilustrativo para su uso como vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

Se pueden obtener lípidos adecuados para su uso de fuentes comerciales. Por ejemplo, se puede obtener dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") de Sigma, St. Louis, MO; se puede obtener fosfato de dicetilo ("DCP") de K & K Laboratories (Plainview, NY); se puede obtener colesterol ("Choi") de Calbiochem-Behring; se pueden obtener dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol pueden almacenarse a aproximadamente -20 °C. El cloroformo se usa como el único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos simples y multilamelares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos cerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh *et al.*, 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o exponer una célula al inhibidor de la presente divulgación, que no forma parte de la invención, para confirmar la presencia de los ácidos nucleicos en la célula hospedadora, pueden realizarse una diversidad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la materia, tales como los análisis por transferencia de Southern y de Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencia de Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes.

ARN

En una realización, el ARN se introduce en los linfocitos T. En otra realización, los ácidos nucleicos son ARNm, tal como ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético. El ARN se produce por transcripción *in vitro* utilizando un molde generado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente por PCR en un molde para la síntesis de ARNm *in vitro* usando cebadores apropiados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plásmido, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. El molde deseado para la transcripción *in vitro* es un factor secretable. A modo de ejemplo, el molde codifica un anticuerpo, una citocina soluble, una quimiocina soluble, un factor de crecimiento o un fragmento funcional o variante de los mismos.

Se puede utilizar PCR para generar un molde para la transcripción *in vitro* de ARNm que después se introduce en las células. Los métodos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para su uso en la PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN que se utilizará como molde para la PCR.

"Sustancialmente complementario", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde la mayoría o todas las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o no coinciden. Las secuencias sustancialmente complementarias pueden hibridar o hibridarse con la diana de ADN pensada en condiciones de hibridación usadas para la PCR. Los cebadores pueden estar diseñados para ser sustancialmente complementarios a cualquier parte del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar para amplificar la porción de un gen que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo 5' y 3' UTR. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una parte de un gen que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo todas o partes de las 5' y 3' UTR. Los cebadores útiles para PCR se generan mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en el molde de ADN que están cadena arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena arriba" se utiliza en el presente documento para referirse a una posición 5' respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la hebra codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a un molde de ADN bicatenario que se encuentra cadena abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena abajo" se usa en el presente documento para referirse a una ubicación 3' respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la hebra codificante.

También se pueden usar estructuras químicas que tienen la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN. El ARN tiene preferentemente 5' y 3' UTR. En una realización, la 5' UTR tiene entre cero y 3000

nucleótidos de longitud. La longitud de las secuencias 5' y 3' UTR que se añadirán a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, que incluyen, pero sin limitación, diseñar cebadores para PCR que hibridan con diferentes regiones de las UTR. Usando este enfoque, un experto en la materia puede modificar las longitudes de 5' y 3' UTR requeridas para lograr una eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

Las 5' y 3' UTR pueden ser de origen natural, las 5' y 3' UTR endógenas para el gen de interés. Como alternativa, las secuencias UTR que no son endógenas al gen de interés se pueden añadir incorporando las secuencias UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación del molde. El uso de secuencias UTR que no son endógenas para el gen de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en secuencias 3' UTR pueden reducir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las 3' UTR se pueden seleccionar o diseñar para aumentar la estabilidad del ARN transcrito en función de las propiedades de las UTR que son bien conocidas en la técnica.

En una realización, la 5' UTR puede contener la secuencia Kozak del gen endógeno. Como alternativa, cuando la PCR añade una 5' UTR que no es endógena al gen de interés como se describe anteriormente, se puede rediseñar una secuencia de Kozak consensuada añadiendo la secuencia 5' UTR. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficacia de la traducción de algunos transcritos de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficaz. La necesidad de las secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocida en la técnica. En otras realizaciones, la 5' UTR puede provenir de un virus de ARN cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden usar diversos análogos de nucleótidos en las 3' o 5' UTR para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin la necesidad de clonar genes, un promotor de transcripción debe estar unido al molde de ADN cadena arriba de la secuencia a transcribir. Cuando se añade una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador directo, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR cadena arriba del marco de lectura abierto que se va a transcribir. En una realización, el promotor es un promotor de polimerasa T7, tal como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero sin limitación, los promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. En la técnica se conocen secuencias de nucleótidos consenso para promotores de T7, T3 y SP6.

En una realización, el ARNm tiene una caperuza en el extremo 5' y una cola de poli(A) en 3' que determina la unión al ribosoma, el comienzo de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En un molde de ADN circular, por ejemplo, ADN plásmido, la ARN polimerasa produce un producto concatamérico largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado al final de la 3' UTR da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota, incluso si se poliadenila después de la transcripción.

En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede prolongar el extremo 3' del transcrito más allá de la última base del molde (Schenborn y Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

El método convencional de integración de tramos de poli(A)/T en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia de poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede causar inestabilidad plasmídica, es por eso que los moldes de ADN plasmídico obtenidos de células bacterianas con frecuencia están altamente contaminados con eliminaciones y otras anomalías. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y lentos, sino que con frecuencia no sean fiables. Esta es la causa por la que un método que permita la construcción de moldes de ADN con tramos de poli(A)/T 3' sin clonación sea muy deseable.

El segmento de poliA/T del molde de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un cebador inverso que contiene una cola de poliT, tal como la cola de 100T (el tamaño puede ser 50-5000 T), o después de la PCR por cualquier otro método, que incluye, pero sin limitación, unión de ADN o recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas.

Las colas de poli(A) de los ARN pueden prolongarse aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos da como resultado un aumento de aproximadamente el doble en la eficacia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Dicha unión puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de poli(A) utilizando la poli(A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

Las caperuzas en 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización preferida, los ARN producidos por los métodos divulgados en el presente documento incluyen una caperuza en 5'. La caperuza en 5' se proporciona usando técnicas conocidas en la materia y descritas en el presente documento (Cougot, *et al.*, Trends in

Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, *et al.*, RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, *et al.*, Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

Los ARN producidos mediante los métodos divulgados en el presente documento también pueden contener una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site, IRES). La secuencia de IRES puede ser cualquier secuencia vírica, cromosómica o diseñada artificialmente que inicie la unión ribosómica independientemente de la caperuza a ARNm y facilite el inicio de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que pueden contener factores que facilitan la permeabilidad y la viabilidad celular tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la molécula interruptor es ARNm. En una realización, el ácido nucleico que codifica la molécula interruptor es ARNm transcrito *in vitro*. En otra realización, el ácido nucleico se somete a electroporación en las células. En otra realización más, el ARNm se introduce por electroporación en las células.

Los métodos divulgados se pueden aplicar a la modulación de la actividad de los linfocitos T en investigación básica y terapia, en los campos del cáncer, células madre, infecciones agudas y crónicas, y enfermedades autoinmunitarias, incluida la evaluación de la capacidad de los linfocitos T genéticamente modificados para eliminar una célula cancerosa diana.

Los métodos también proporcionan la capacidad de controlar el nivel de expresión en un amplio intervalo cambiando, por ejemplo, el promotor o la cantidad de ARN de entrada, haciendo posible regular individualmente el nivel de expresión. Asimismo, la técnica de la producción de ARNm basada en PCR facilita enormemente el diseño de los ARNm de las moléculas interruptor con diferentes estructuras y la combinación de sus dominios. Por ejemplo, incluir múltiples moléculas interruptor en la misma célula permite la secreción de múltiples factores de activación que pueden activar los linfocitos T, potenciar la función de los linfocitos T o modular las respuestas inmunitarias de otras células diana hacia las células enfermas.

Una ventaja de los métodos de transfección de ARN es que la transfección de ARN es esencialmente transitoria y sin vectores. Un transgén de ARN se puede suministrar a un linfocito y se puede expresar en él después de una breve activación celular *in vitro*, como un casete de expresión mínimo sin la necesidad de secuencias víricas adicionales. En estas condiciones, la integración del transgén en el genoma de la célula hospedadora es improbable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficacia de la transfección del ARN y a su capacidad para modificar uniformemente toda la población de linfocitos.

La modificación genética de linfocitos T con ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN) utiliza dos estrategias diferentes que se han probado sucesivamente en varios modelos animales. Las células se transfectan con ARN transcrito *in vitro* mediante lipofección o electroporación. Es deseable estabilizar el IVT-ARN utilizando diversas modificaciones para lograr una expresión prolongada del IVT-ARN transferido.

Se conoce en la bibliografía que algunos vectores IVT se utilizan de manera convencional como molde para la transcripción *in vitro* y que se han modificado genéticamente de tal manera que se producen transcritos de ARN estabilizados.

Actualmente, los protocolos utilizados en la técnica se basan en un vector plasmídico con la siguiente estructura: un promotor de ARN polimerasa 5' que permite la transcripción de ARN, seguido de un gen de interés que está flanqueado en 3' y/o 5' por regiones no traducidas (UTR), y un casete de poliadenilo 3' que contiene nucleótidos 50-70 A. Antes de la transcripción *in vitro*, el plásmido circular se linealiza cadena abajo del casete de poliadenilo mediante enzimas de restricción de tipo II (la secuencia de reconocimiento se corresponde con el sitio de escisión). El casete de poliadenilo se corresponde, por lo tanto, con la secuencia posterior de poli(A) en el transcrito. Como resultado de este procedimiento, algunos nucleótidos permanecen como parte del sitio de escisión enzimática después de la linealización y prolongan o enmascaran la secuencia de poli(A) en el extremo 3'. No está claro, si este saliente no fisiológico afecta a la cantidad de proteína producida intracelularmente a partir de tal construcción.

El ARN tiene varias ventajas sobre las estrategias víricas o plasmídicas más tradicionales. La expresión génica de una fuente de ARN no requiere transcripción y el producto proteico se produce rápidamente después de la transfección. Adicionalmente, debido a que el ARN solo tiene que acceder al citoplasma, en lugar del núcleo, por lo tanto, los métodos de transfección típicos dan como resultado una tasa de transfección extremadamente alta. Además, las estrategias basadas en plásmidos requieren que el promotor que dirige la expresión del gen de interés esté activo en las células en estudio.

En otro aspecto, la construcción de ARN se puede suministrar a las células por electroporación. Véanse, por ejemplo, las formulaciones y la metodología de electroporación de construcciones de ácidos nucleicos en células de mamíferos tal como se enseña en los documentos US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1.

Los diversos parámetros que incluyen la intensidad del campo eléctrico necesaria para la electroporación de cualquier tipo de célula conocida se conocen generalmente en la bibliografía de investigación relevante, así como en numerosas patentes y solicitudes en el campo. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.678.556, la patente de Estados Unidos n.º 7.171.264, y la patente de Estados Unidos n.º 7.173.116. Los equipos para la aplicación terapéutica de electroporación están disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de terapia de electroporación de ADN MedPulser™ (Inovio/Genetronics, San Diego, California), y se describen en patentes tales como la patente de Estados Unidos n.º 6.567.694; la patente de Estados Unidos n.º 6.516.223, la patente de Estados Unidos n.º 5.993.434, la patente de Estados Unidos n.º 6.181.964, la patente de Estados Unidos n.º 6.241.701, y la patente de Estados Unidos n.º 6.233.482; la electroporación también se puede usar para la transfección de células *in vitro* tal como se describe, por ejemplo, en el documento US20070128708A1. La electroporación también se puede utilizar para suministrar ácidos nucleicos a las células *in vitro*. En consecuencia, la administración mediada por electroporación en células de ácidos nucleicos, incluidas las construcciones de expresión que utilizan cualquiera de los muchos dispositivos disponibles y sistemas de electroporación conocidos por los expertos en la materia, presenta un nuevo y emocionante medio para suministrar un ARN de interés a una célula diana.

Activación y expansión de linfocitos T

Cuando el linfocito T se activa antes de la introducción a los ácidos nucleicos, pueden activarse moléculas coestimuladoras en el linfocito T. Los ejemplos de activación del linfocito T pueden incluir la estimulación de CD3 y/o CD28, tal como a través de anticuerpos contra CD3 y/o CD28. El medio usado para cultivar los linfocitos T puede incluir un agente que pueda activar los linfocitos T. Por ejemplo, un agente que puede estimular CD3 es un anticuerpo contra CD3, y un agente que puede estimular CD28 es un anticuerpo contra CD28.

En otra realización, el linfocito T puede activarse y/o expandirse antes de la introducción del ácido nucleico. Generalmente, los linfocitos T de la invención se pueden expandir por contacto con una superficie que tiene unido un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimulante en la superficie de los linfocitos T. Como alternativa, los linfocitos T pueden expandirse mediante cultivo u otros métodos de manera que los linfocitos T se encuentren dentro de una población.

En un aspecto, el método para generar los linfocitos T puede comprender además el aislamiento de los linfocitos T y una electroporación posterior seguida de cultivo. Después del aislamiento, los linfocitos T se pueden incubar en medio celular en un aparato de cultivo durante un período de tiempo o hasta que las células alcancen la confluencia o alta densidad celular para un pase óptimo antes de pasar las células a otro aparato de cultivo. El aparato de cultivo puede ser cualquier aparato de cultivo comúnmente utilizado para cultivar células *in vitro*. Un período de tiempo puede ser cualquier tiempo adecuado para el cultivo de células *in vitro*. El medio de linfocitos T se puede reemplazar durante el cultivo de los linfocitos T en cualquier momento. Preferentemente, el medio de linfocitos T se reemplaza aproximadamente cada 2 a 3 días. A continuación, los linfocitos T se recogen del aparato de cultivo, después de lo cual los linfocitos T se pueden utilizar inmediatamente para la introducción de ácidos nucleicos o se crioconservan para almacenarlos para su uso en un momento posterior. En una realización, el método comprende además crioconservar los linfocitos T antes de la introducción del ácido nucleico. En otra realización, el método comprende además crioconservar los linfocitos T. En otra realización más, los linfocitos T crioconservados se descongelan antes de la introducción del ácido nucleico de la molécula interruptor, de la formulación en una composición para expresar transitoriamente la molécula interruptor y de secretar el factor de activación, o administración a un sujeto.

Las células pueden expandirse *ex vivo* usando un método descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.199.942. La expansión, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.199.942 puede ser una alternativa o sumarse a otros métodos de expansión descritos en el presente documento. Brevemente, el cultivo y expansión *ex vivo* de los linfocitos T comprende la adición a los factores de crecimiento celular, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.199.942, u otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-2, IL-3 y ligando c-kit, por ejemplo como los descritos en Dudley *et al.*, J. Immunol., 26(4):332-342, 2003, para un protocolo de expansión rápida (Rapid Expansion Protocol, REP). En una realización, expandir los linfocitos T comprende cultivar los linfocitos T con un factor seleccionado del grupo que consiste en flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit.

La etapa de cultivo como se describe en el presente documento (contacto con agentes como se describe en el presente documento) puede ser muy corto, por ejemplo menos de 24 horas tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 horas. La etapa de cultivo como se describe adicionalmente en el presente documento (contacto con agentes como se describe en el presente documento) puede ser largo, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más días.

Se utilizan varios términos para describir las células en cultivo. Cultivo celular se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas en condiciones controladas. Un cultivo celular primario es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo y antes del primer subcultivo. Las células se expanden en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, dando como resultado una mayor población de células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular generalmente se mide por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número, también conocido como tiempo de duplicación.

Cada ronda de subcultivo se denomina pase. Cuando las células se subcultivan, se dice que se han sometido a pases. Una población específica de células, o una línea celular, a veces se hace referencia o se caracteriza por la cantidad de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a diez pases puede denominarse cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de células a partir de tejido se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el período de pase; por lo tanto, el número de duplicaciones de población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre pases depende de muchos factores, incluyendo, entre otros, la densidad de siembra, sustrato, medio y tiempo entre pases.

En una realización, las células se pueden cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero de horas intermedio. Las condiciones adecuadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio adecuado (p. ej., medio mínimo esencial o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (p. ej., suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato, y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o complementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de una o más citocinas suficiente para el crecimiento y la expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (p. ej., 37 °C) y atmósfera (p. ej., aire más CO₂ al 5 %) adecuadas.

El medio usado para cultivar los linfocitos T puede incluir un agente que pueda coestimular los linfocitos T. Por ejemplo, un agente que puede estimular CD3 es un anticuerpo contra CD3, y un agente que puede estimular CD28 es un anticuerpo contra CD28. Esto se debe a que, como lo demuestran los datos divulgados en el presente documento, una célula aislada por los métodos divulgados en el presente documento se puede expandir aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10.000 veces, 100.000 veces, 1.000.000 veces, 10.000.000 veces, o más. En una realización, los linfocitos T se expanden en el intervalo de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 50 veces, o más, cultivando la población sometida a electroporación.

En otra realización, el método para generar los linfocitos T puede comprender además aislar los linfocitos T sometidos a electroporación para otras aplicaciones. En otra realización más, el método para generar los linfocitos T puede comprender además una electroporación posterior de los linfocitos T sometidos a electroporación seguida de cultivo. La electroporación posterior puede incluir la electroporación de un ARNm que codifica una molécula interruptor adicional o un agente que estimula el linfocito T. El agente puede estimular el linfocito T, tal como, estimulando una mayor expansión, función efectora u otra función de los linfocitos T. En una realización, el ARNm del agente se somete a electroporación conjunta con el ARNm de la molécula interruptor. En otra realización, el linfocito T se somete a electroporación en serie con ARNm para la molécula interruptor, después con ARNm para el agente. En otra realización más, el linfocito T se cultiva o se le permite un tiempo de recuperación entre las etapas de electroporación.

En otra realización, el método comprende además estimular los linfocitos T sometidos a electroporación con al menos una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BBL y PD1.

Terapia

Los linfocitos T descritos en el presente documento pueden incluirse en una composición para terapia. La composición puede incluir una composición farmacéutica e incluir además un transportador farmacéuticamente aceptable. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende los linfocitos T.

En un aspecto, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para suministrar un factor a un sitio diana, comprendiendo el método introducir un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor en una población de células que comprende linfocitos T modificados, en donde la molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo; y administrar la población de células a un sujeto que lo necesite, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su

correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana.

En dicho un aspecto, la población de células puede incluir cualquiera de células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T. Los linfocitos T en la población también pueden activarse y expandirse como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para suministrar un factor a un sitio diana, comprendiendo el método administrar una población de células a un sujeto que lo necesite, en donde los linfocitos T expresan transitoriamente una molécula interruptor, en donde la molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un IL-12R o un fragmento del mismo, y en donde la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana.

En otro aspecto más, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para suministrar un factor a un sitio diana, comprendiendo el método administrar una población de células a un sujeto que lo necesite. Los linfocitos T del método expresan transitoriamente una molécula interruptor, en donde la molécula interruptor comprende un dominio extracelular que comprende un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un IL-12R o un fragmento del mismo. La interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su correspondiente ligando induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana. En otro aspecto más, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para suministrar un factor a un sitio diana. El método incluye administrar una población de células que comprende linfocitos T a un sujeto que lo necesite. Los linfocitos T se alojan en el sitio diana y expresan transitoriamente una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y un antígeno en un linfocito T activador. El método incluye además la activación de los linfocitos T en el sitio diana, en donde se induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación. En una realización, la activación de los linfocitos T comprende unir un ligando al dominio extracelular de la molécula interruptor. En otra realización, la activación de los linfocitos T comprende unir el anticuerpo biespecífico al antígeno de linfocitos T activadores en los linfocitos T.

En otro aspecto, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para tratar una enfermedad o afección que comprende administrar una población de linfocitos T modificados que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor. En una realización ilustrativa, los linfocitos T comprenden un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, un receptor del factor de crecimiento, un receptor hormonal y otro receptor de señalización; y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo, y en donde los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con su ligando correspondiente induce a los linfocitos T a secretar un factor de activación en el sitio diana. Los linfocitos T pueden administrarse para inducir la lisis de la célula o tejido diana.

En otro aspecto más, se incluye, pero no forma parte de la presente invención, un método para tratar una enfermedad o afección. El método incluye administrar una población de linfocitos T modificados que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular que comprende un receptor de membrana o un fragmento del mismo y un dominio intracelular que comprende un receptor de señalización o un fragmento del mismo y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico que comprende biespecificidad para un antígeno en una célula diana y un antígeno en un linfocito T activador. En dicho un aspecto, los linfocitos T expresan transitoriamente la molécula interruptor y el anticuerpo biespecífico y la activación de los linfocitos T induce la secreción de un factor de activación en el sitio diana, tratando así la enfermedad o afección.

Los linfocitos T generados como se describe en el presente documento son generalmente uniformes y poseen función de linfocitos T. Adicionalmente, los linfocitos T se pueden administrar a un mamífero, preferentemente un ser humano, para suprimir una reacción inmunitaria, tal como las comunes a las enfermedades autoinmunitarias como la diabetes, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, GVHD, potenciación de la inducción de tolerancia del aloinjerto, rechazo de trasplantes, y similares. Además, las células de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de cualquier afección en la que se desea una respuesta inmunitaria disminuida o inhibida de otra manera, especialmente una respuesta inmunitaria mediada por células, para tratar o aliviar la enfermedad.

Los linfocitos T modificados generados como se describe en el presente documento también se pueden usar para tratar una enfermedad o afección que sea una enfermedad autoinmunitaria. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, que es una enfermedad vírica con un componente autoinmunitario), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED, por sus siglas en inglés), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS, por sus siglas en inglés), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP, por sus siglas en inglés), enfermedad de Behcet,

miocardiopatía, esprúe celíaco-dermatitis herpetiforme; síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS, por sus siglas en inglés), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD, por sus siglas en inglés), penfigoide cicatricial, enfermedad de las crioaglutininas, síndrome de crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Dego, dermatomiositis-juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, por sus siglas en inglés), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS, por sus siglas en inglés), también conocida como esclerosis sistémica (SS, por sus siglas en inglés)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

Los linfocitos T modificados generados como se describe en el presente documento también se pueden usar para tratar una enfermedad o afección que sea un trastorno inflamatorio. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, entre otros, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen la enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eccema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra huésped, anemias hemolíticas, artrosis, septicemia, accidente cerebrovascular, trasplante de tejidos y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilador.

Los linfocitos T sometidos a electroporación generados como se describe en el presente documento también se pueden usar para tratar una enfermedad o afección que sea cáncer, tal como el cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y combinaciones de los mismos.

En otra realización, los linfocitos T descritos en el presente documento pueden usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesite.

Las células de la invención se pueden administrar en dosificaciones y vías y en momentos que se determinarán en experimentos y ensayos preclínicos y clínicos apropiados. Las composiciones de células se pueden administrar varias veces en dosis dentro de estos intervalos. La administración de las células de la invención se puede combinar con otros métodos útiles para tratar la enfermedad o afección deseadas según lo determinen los expertos en la materia.

Las células de la invención a administrar pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto sometido a terapia.

La administración de las células de la invención se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente conocida por los expertos en la materia. Las células de la presente invención se pueden administrar a un sujeto por inhalación mediante aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodular, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.), o por vía intraperitoneal. En otros casos, las células de la invención se inyectan directamente en un sitio de inflamación en el sujeto, un sitio de enfermedad local en el sujeto, ganglio linfático, un órgano, un tumor y similares.

Las células descritas en el presente documento también se pueden administrar utilizando cualquier número de matrices. La presente invención utiliza tales matrices dentro del contexto novedoso de actuar como un órgano linfóide artificial para apoyar, mantener o modular el sistema inmunitario, normalmente a través de la modulación de los linfocitos T. En consecuencia, la presente invención puede utilizar aquellas composiciones y formulaciones de matriz que han demostrado utilidad en la ingeniería de tejidos. En consecuencia, el tipo de matriz que se puede utilizar en las composiciones, los dispositivos y métodos de la invención son prácticamente ilimitados y pueden incluir matrices tanto biológicas como sintéticas. En un ejemplo determinado, se utilizan las composiciones y dispositivos expuestos por las patentes de los Estados Unidos n.º 5.980.889; 5.913.998; 5.902.745; 5.843.069; 5.787.900; o 5.626.561. Las matrices comprenden características comúnmente asociadas con ser biocompatibles cuando se administran a un hospedador mamífero. Las matrices se pueden formar a partir de materiales naturales y/o sintéticos. Las matrices pueden no ser biodegradables en los casos en que sea deseable dejar estructuras permanentes o estructuras removibles en el organismo de un animal, tal como un implante; o ser biodegradables. Las matrices pueden adoptar la forma de esponjas, implantes, tubos, almohadillas telfa, fibras, fibras huecas, componentes liofilizados, geles, polvos, composiciones porosas o nanopartículas. Además, las matrices pueden diseñarse para permitir la liberación sostenida de células sembradas o de citocinas producidas u otro agente activo. En determinadas realizaciones, la matriz es flexible y elástica, y puede describirse como un amazón semisólido que es permeable a sustancias tales como sales inorgánicas, fluidos acuosos y agentes gaseosos disueltos, incluido el oxígeno.

En el presente documento se utiliza una matriz como ejemplo de una sustancia biocompatible. Sin embargo, la invención actual no se limita a matrices y, por lo tanto, dondequiera que aparezca el término matriz o matrices, se entenderá que estos términos incluyen dispositivos y otras sustancias que permiten la retención celular o el traspaso celular, son biocompatibles y son capaces de permitir el traspaso de macromoléculas directamente a través de la sustancia, de modo que la propia sustancia es una membrana semipermeable, o se usan junto con una sustancia semipermeable particular.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un linfocito T modificado o una población de linfocitos T modificados como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa.

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

En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en el presente documento se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferentemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosis. Las células se pueden administrar mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen habitualmente en inmunoterapia (véase, p. ej., Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). Un experto en la materia de la medicina puede determinar fácilmente la dosis óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular haciendo un seguimiento del paciente en busca de signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

En determinadas realizaciones, se puede desear administrar linfocitos T modificados a un sujeto y después volver a extraer sangre posteriormente (o realizar una aféresis), activar los linfocitos T de la misma según la presente invención, y reinfundir al paciente con estos linfocitos T activados y modificados. Este proceso se puede llevar a cabo varias veces cada pocas semanas. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se pueden activar a partir de extracciones de sangre de 10 ml a 400 ml. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml o 100 ml. Sin desear quedar ligado a la teoría, usando este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple, se pueden seleccionar determinadas poblaciones de linfocitos T.

En determinadas realizaciones de la presente invención, los linfocitos T activados y modificados usando los métodos descritos en el presente documento, u otros métodos conocidos en la técnica donde los linfocitos T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después de) cualquiera de varias modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento con agentes tales como terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-C) o natalizumab para pacientes con EM o el tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En realizaciones adicionales, los linfocitos T de la invención se pueden usar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por factor de crecimiento (rapamicina). (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, de manera simultánea o después de) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T usando agentes quimioterapéuticos tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de linfocitos B, tal como agentes que reaccionan con CD20, p. ej., Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos se pueden someter a un tratamiento convencional con altas dosis de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de los linfocitos T modificados de la presente invención. En una realización adicional, los linfocitos T se administran antes o después de la cirugía.

La dosificación de los tratamientos anteriores que se va a administrar a un paciente variará según la naturaleza precisa de la afección que se está tratando y el receptor del tratamiento. Se puede variar la escala de las dosis para la

administración en seres humanos según las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, estará, en general, en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, administrado de forma habitual diariamente durante un periodo de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg al día, aunque en algunos casos se pueden usar dosis mayores de hasta 40 mg al día (descrita en la patente de los Estados Unidos n.º 6.120.766).

Debe entenderse que el método y las composiciones que serían útiles en la presente invención no se limitan a las formulaciones particulares expuestas en los ejemplos.

La puesta en práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de las competencias del experto. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", cuarta edición (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002). Estas técnicas son aplicables a la producción de polinucleótidos y polipéptidos y, como tal, pueden tenerse en cuenta en la fabricación y puesta en práctica de la invención. Las técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se analizarán en las secciones que aparecen a continuación.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

Los materiales y métodos usados en la realización de los experimentos divulgados en el presente documento se describen a continuación.

Construcción de vectores para la transcripción *in vitro* (IVT) de ARNm. Todas las moléculas interruptor para PD1-CD28, PD1-41BB y TGF β R-IL12R y Bis-ARN se sintetizaron y/o amplificaron y ensamblaron mediante PCR en función de la información de secuenciación proporcionada por las patentes publicadas relevantes. Los productos de PCR se subclonaron en el vector basado en pGEM.64A reemplazando GFP de pGEM-GFP.64A para producir vectores basados en pGEM.64A.

Transcripción *in vitro* (IVT) de ARN. Se utilizó mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra (Ambion, Inc) para generar IVT de ARN con análogo de la caperuza antiinversión (ARCA, 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG)m7G(5')ppp(5')G). Los productos de IVT de ARN se purificaron usando un mini kit RNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA) y el ARN purificado se eluyó en agua sin RNasa a 1-2 mg/ml.

Electroporación con ARN de linfocitos T. Se sometieron a electroporación linfocitos T en reposo purificados o linfocitos T estimulados con perlas con CD3/CD28 usando BTX EM830 (Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, EE. UU.). Los linfocitos T sometidos a electroporación se lavaron tres veces con OPTI-MEM (Invitrogen) y se resuspendieron en OPTI-MEM a la concentración final de $1-3 \times 10^8$ /ml. Posteriormente, se mezclaron 0,1 ml de las células con 10 μ g de IVT de ARN (o como se indica) y se sometieron a electroporación en una cubeta de 2 mm.

Detección de CAR en linfocitos T sometidos a electroporación. Las células se lavaron y suspendieron en tampón FAC (PBS más azida de sodio al 0,1 % y BSA al 0,4 %). Se añadieron anticuerpos policlonales de cabra anti-F(ab)2 de ratón marcados con biotina (para scFv murino) o anti-F(ab)2 humano (para scFv humano) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) al tubo y las células se incubaron a 4 °C durante 25 minutos y se lavaron dos veces. A continuación, las células se tiñeron con estreptavidina marcada con ficoeritrina (BD Pharmingen, San Diego, CA).

ELISA. Las células diana se lavaron y suspendieron a 10^6 células/ml en R10. Se añadieron cien mil de cada tipo de célula diana a cada uno de los 2 pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning). Los cultivos de linfocitos T efectoras se lavaron y suspendieron a 10^6 células/ml en R10. Se combinaron cien mil linfocitos T efectoras con células diana en los pocillos indicados de la placa de 96 pocillos. Además, se prepararon pocillos que contenían linfocitos T solos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 a 20 horas. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante y se sometió a un ensayo ELISA utilizando métodos convencionales (Pierce, Rockford, IL).

Tinción con CD107a. Las células se sembraron en placa a una E:T de 1:1 (10^5 efectoras: 10^5 dianas) en 160 μ l de medio RPMI completo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 20 μ l de Ac anti-CD 107a marcado con ficoeritrina (BD Pharmingen, San Diego, CA) y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora antes de añadir Golgi Stop e incubó durante otras 2,5 horas. Después de 2,5 horas, se añadieron 10 μ l de FITC-anti-CD8 y APC-anti-CD3 y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Después de la incubación, las muestras se lavaron una vez con tampón FACS. La adquisición de citometría de flujo se realizó con un BD FACS Calibur (BD Biosciences), y el análisis se realizó con FlowJo (Treestar Inc, Ashland, OR).

Ensayo de proliferación de linfocitos T basado en CFSE. Se marcaron linfocitos T a una concentración de 10×10^6 /ml en PBS con CFSE a 3 μ M durante 3 min 30 s a temperatura ambiente. Se detuvo el marcaje con FBS al

5 % (en PBS) y se lavaron dos veces con R10 y se cultivaron en R10 con 10 UI/ml de IL2. Después del cultivo durante la noche, los linfocitos T marcados con CFSE se sometieron a electroporación. De dos a cuatro horas después de la electroporación, los linfocitos T se estimularon con tumor irradiado o líneas celulares K562 a T:estimulador a 1:1. La dilución de CFSE se examinó mediante citometría de flujo y el número de células se contó en el momento indicado.

Los resultados de los experimentos divulgados en el presente documento se describen a continuación.

Los dominios extracelulares y transmembrana del receptor I del TGF beta y del receptor II del TGF beta se fusionaron con los dominios intracelulares de los receptores b1 y b2 de IL-12, respectivamente, para generar TGFbR-IL-12RI y TGFbR-IL-12R2. Estas construcciones se clonaron en un vector de transcripción *in vitro* de ARN basado en pGEM.64A. Véase la **figura 1**.

Se construyeron múltiples moléculas interruptor de PD1 y 4-1BB, como se enumera en **figura 2**, en función de la estructura de los dominios extracelulares de 4-1BB. Se detectaron moléculas interruptor PD1-41BB y moléculas CAR en linfocitos T sometidos a electroporación conjunta con ARN de PD1-41BB y CD19Z. Las construcciones de moléculas interruptor de PD1, como se enumera en la **figura 2**, se sometieron a prueba para determinar su expresión al introducir por electroporación el ARN de la molécula interruptor junto con el ARN de CD19Z. Véase la **figura 3**.

La señalización de TGF beta se cambió a la señalización de IL-12 tanto en los linfocitos T como en las células NK. Los linfocitos T se sometieron a electroporación con 5 µg de ARN como se indica y se estimularon con diferentes cantidades de anticuerpo OKT3 con o sin adición de 10 ng/ml de TGF-beta. La secreción de IFN-gamma se sometió a ensayo mediante ELISA después de la estimulación durante la noche. La molécula interruptor IFNgR-IL-12R se utilizó como control positivo (**figura 4**). Las células NK CD56+ aisladas de un donante normal de PBMC se sometieron a electroporación con ARN como se indica y se estimularon con K562 con o sin la adición de 10 ng/ml de TGF-beta. La secreción de IFN-gamma se sometió a ensayo mediante ELISA después de 4 horas de estimulación. La molécula interruptor IFNgR-IL-12R se utilizó como control positivo (**figura 4**).

Producción de IFN-gamma en linfocitos T que se sometieron a electroporación con diferentes moléculas interruptor de TGFb, estimulados con anticuerpo OKT3 a diferentes concentraciones y cultivados en presencia de TGFbeta soluble. La **figura 4** muestra una mayor producción de IFN-gamma en linfocitos T con TGFbR-IL-12R en presencia de TGFb (TGFbR-IL-12 y TGFb soluble), lo que indica que la señal de TGFb se cambió a una señal de IL-12 que dio como resultado una mayor producción de IFN-gamma. Esto se confirmó adicionalmente por el aumento de la secreción de IFN-gamma de las células NK que se sometieron a electroporación con la molécula interruptor TGFbR-IL-12R en presencia de TGFb. (**figura 5**).

Stat4 es un factor de transcripción crítico para la señalización de IL-12. Se encontró que solamente los linfocitos T sometidos a electroporación con TGFbR-IL12R en presencia de TGF-beta mostraron Stat4 fosforilado (pStat4) detectable (**figura 6**). Los linfocitos T se sometieron a electroporación con 5 µg de ARN como se indica. Después de 4 horas, se añadieron 10 ng/ml de TGFb1 y 30min después, se examinó pStat4 (señal de IL-12) mediante tinción intracelular de pStat4.

Para probar si tanto TGFbR-IL-12R como aTGFbII-1412 afectan negativamente a la señal de TGFbeta en los linfocitos T como TGFbeta negativo dominante (DNTGFb), los linfocitos T se electroporaron con ARN como se indica en **figura 7** y se estimularon con 5 ng/ml de TGFb durante 30 min. La Smad fosforilada (pSmad) se midió mediante citometría de flujo. Se descubrió que, en comparación con el ARN de control (IFNgR-IL-12R) y sin electroporación (sin EP), pSmad estaba reprimida por linfocitos T sometidos a electroporación con TGFbR-IL12R o TGFbII-3-1412, así como por linfocitos T con TGFb negativo dominante (DNTGFb). Los linfocitos T con TGFbR-IL-12R o aTGFbII-3-1412 mostraron una disminución significativa de pSmad, lo que sugiere que estas dos moléculas interruptor no solo cambiaban las señales de TGFb a IL-12 o CD28, sino que también tenían la capacidad de servir como moléculas negativas dominantes contra TGFb.

Las **figuras 8 y 9** muestran que los linfocitos T sometidos a electroporación con 5 ug de ARN de TGFbR-IL-12R o 5 ug de ARN de TGFbR-1412 bloquearon la señalización de TGF-beta de manera tan eficaz como el TGFbRII dominante (DNTGFbR). Después de 4 horas, se añadieron 10 ng/ml de TGFb1 y 30min después, se examinó pSmad (señal de TGF-beta) mediante tinción intracelular de pStat4. Se usó IFNgR-IL12R como control, mostrando una pSmad aumentada.

Los linfocitos T reguladores (Treg) desempeñan papeles muy importantes que influyen negativamente en la inmunidad tumoral. Las moléculas de suministro con actividades anti-Treg por linfocitos T sometidos a electroporación con ARN pueden mejorar potencialmente la actividad antitumoral de los linfocitos T sometidos a transferencia adoptiva al resistir la inducción de Treg. Los linfocitos T se marcaron con CFSE y se sometieron a electroporación conjunta con Her2 CAR (4D5-BBZ) y moléculas interruptor como se indica. Cuatro horas después, los linfocitos T sometidos a electroporación se estimularon con K562 que expresan Her2/neu irradiadas en presencia de Treg naturales recién aislados a Tefect: Treg=8:1. Se siguió la dilución de CFSE usando citometría de flujo en el día 6 y el día 8 después de la estimulación. Se indujo una proliferación significativa de linfocitos T mediante la electroporación de las moléculas interruptor, aTGFbII-3-1412 y TGFbR-IL12R. Los linfocitos T mostraron una mayor resistencia a la supresión de Treg

de los linfocitos T que expresan una molécula interruptor aTGFbR-CD28 (aTGFbR-1412) (**figura 10**).

Se indujeron linfocitos T reguladores (Tregs) a partir de linfocitos T vírgenes clasificados. Se utilizaron tres métodos diferentes: 1.) Ac: perlas, 65U/ml de IL-2, 32 U/ml de TGF-b1, 4500 U/ml de IL-15, 10ug/ml de anti-IL-12, 20ug/ml anti-IFN-g en X-Vivo-15 con FBS al 10 %. 2.) Perlas 20 *: Perlas (20 perlas: 1 célula), 20U/ml de IL-2, 2ng/ml de TGF-b1 en AIM-V. 3.) 1/10 perlas: Perlas (1 perla: 10 células), 100 U/ml de IL-2, 5 ng/ml de TGF-b1+atRA 100 nM en AIM-V con tampón Hepes 10 mM y estreptomycin.

La **figura 11** muestra la expresión de Foxp3 en Tregs inducidos (iTregs) y la **figura 12** muestra una disminución de la producción de citocinas de iTregs (estimulación con PMA) en iTregs pero no en las células efectoras. Los iTregs también suprimieron la proliferación de linfocitos T efectoras (Tefect.) (**figura 13**).

La expresión de Foxp3 se redujo (**figura 14**) lo que dio lugar a la capacidad reducida de suprimir la proliferación de linfocitos T en un ensayo de dilución con CFSE (**figura 15**). Los linfocitos T CD4 vírgenes clasificados se sometieron a electroporación con ARN como se indica y se agregaron a tres sistemas inductores de Treg diferentes como se indica. 5 días después, la expresión de Foxp3 se examinó mediante citometría de flujo. Los linfocitos T se marcaron con CFSE y se sometieron a electroporación conjunta con CAR her2 (4eD5-BBZ) y moléculas interruptor como se indica. Cuatro horas después, los linfocitos T sometidos a electroporación se estimularon con K562 que expresaban Her2/Neu irradiadas en presencia de Tregs inducidos durante 5 días a partir de linfocitos T CD4 vírgenes transferidos con ARN como se indica a Tefect: Treg=8:l. Se siguió la dilución de CFSE usando citometría de flujo el día 4 después de la estimulación.

Para probar la sensibilidad de los linfocitos T con Bis-ARN para el reconocimiento de tumores, los linfocitos T se sometieron a electroporación con diferentes dosis de Bis-ARN y se compararon con ARN CD19 CAR. Se obtuvieron resultados similares del aumento de CD107a (**figura 16A**).

En los experimentos de tinción intracelular de IFN-gamma/Granzima B (**figura 16B**) y producción de IFN-gamma analizada por ELISA (**figura 16C**), se observó una activación significativa de linfocitos T cuando se usaron tan solo 0,5 µg de Bis-ARN. Sin embargo, 1-2 µg de Bis-ARN seguían siendo comparables con 5-10 µg de ARN CD19 CAR. A pesar de que el Bis-ARN está a 0,5 µg en la dosis baja, los linfocitos T con Bis-ARN y los linfocitos T GFP-ARN incubados juntos siguieron mostrando actividades antitumorales eficientes.

En un ensayo de linfocitos T citotóxicos de cuatro horas, se comparó la capacidad lítica de los linfocitos T con diferentes cantidades de ARN a las dosis de 1, 5 y 10 µg de Blinatumomab Bis-ARN o ARN CD19BBZ CAR. Como se muestra en la **figura 16D**, la capacidad de destrucción de los linfocitos T mostró una correlación con las dosis de ARN tanto para Bis-ARN como para ARN de CAR.

Para probar la persistencia funcional de los linfocitos T sometidos a electroporación con ARN de Blinatumomab, se electroporaron dosis crecientes de ARN en los linfocitos T, en comparación con el ARN CD19 CAR. La reactivación de linfocitos T específicos de antígeno mediante la estimulación de linfocitos T con líneas tumorales CD19+ en diferentes momentos después de la electroporación se siguió observando aumentados de CD107a. Como ya se muestra en **figura 16A** para el día 1 después de la electroporación, siempre que la dosis de ARN fuera superior a 1 µg, los linfocitos T Bis-ARN podrían activarse con tanta eficiencia como 5-10 µg de linfocitos T CD19-CAR.

Se diseñaron cuatro anticuerpos bis-específicos que usan scFv que podrían bloquear PD-L1 (de la patente n.º AU2006265108A1) y un scFv anti-CD28 (1412, documento US7.585.960 B2) y se sintetizaron genes por PCR (**figura 17**). La secuenciación verificó que el ADN se clonó correctamente en los vectores de transcripción de ARN *in vitro* basados en pGEM.64A para generar pGEM.10A5-I-1412, pGEM.13G4-1412, pGEM.1b12-1412 y pGEM.12A4-1412, véase la **figura 18**.

La producción de citocinas (IL2 (**figura 19A**) e IFN-gamma (**figura 19B**) detectada por ELIA mostró que la molécula interruptor PD1-CD28, 10A5-1412 (bi-ARN de aPD1-aCD28) y 13G4-1412 (bi-ARN de aPD1-aCD28) podrían mejorar significativamente la función de los linfocitos T aumentando la secreción tanto de IL-2 como de IFN-gamma. Este cambio de función sugirió que una señal negativa de PD1 se cambió a una señal positiva de CD28. Los linfocitos T con interruptor Bis-ARN 10A5-1412 (aPD1-aCD28 bi-RNA) y 13G4-1412 (aPD1-aCD28 bi-RNA) mostraron una mayor producción de citocinas, lo que sugiere que estos linfocitos T modificados por ingeniería podrían suministrar moléculas de activación que mejorarían positivamente la función de los linfocitos T.

Se diseñaron aTGFbRII-1 y aTGFbRII-3 (de la patente de los Estados Unidos n.º US8.147.834.B2) y un scFv anti-CD28 (1412, US7.585.960 B2) y los genes se sintetizaron por PCR. La secuenciación verificó que el ADN se clonó correctamente en los vectores de transcripción de ARN *in vitro* basados en pGEM.64A para generar pGEM.aTGFbR-1-1412 y pGEM.aTGFbR-3-1412. Véase la **figura 20**.

Listado de secuencias:

TGFbR-IL12RI, SEQ ID NO:1

Atggaggcggcggtcgtgctccgcgtccccggctgctcctcctcgtgctggcggcgggcgggcgggcgggcggt
gctccccggggcgacggcggttacagtgtttctgccacctctgtacaaaagacaattttacttgtgtgacagatgggctctgctttgtc
tctgtcacagagaccacagacaaaagttatacacaacagcatgtgtatagctgaaattgacttaattcctcgagataggccgtttgtat
gtgcacctcttcaaaaactgggtctgtgactacaacatattgctgcaatcaggaccattgcaataaaatagaactccaactactgt
aaagtcacacctggccttggtcctgtggaactggcagctgtcattgctggaccagtgtcttcgtctgcatctcactcatgttgatg
gtctatatcagggccgcacggcacctgtgcccgcgtgcccacacctgtgccagctccgccattgagttccctggaggga
ggagacttggcagtggaatcaaccagtggaactccaggaagaggcatccctgcaggaggccctggtgtagagatgtcctggg
acaaaggcgagaggactgagcctctcgagaagacagagctacctgagggtgcccctgagctggccctggatacagagttgtc
cttgaggatggagacaggtgcaaggccaagatgtga

TGFbR-IL12R2, SEQ ID NO:2

5

Atgggtcgggggctgctcaggggcctgtggccgctgcacatcgctcctgtggacgcgtatgccagcacgatcccaccgcacg
ttcagaagtcgggtaataacgacatgatagtcactgacaacaacgggtgcagtcaagttccacaactgtgtaattttgtgatgtgag
atftccacctgtgacaaccagaaatcctgcatgagcaactgcagcatcacctccatctgtgagaagccacaggaagtctgtgtg
ctgtatggagaaagaatgacgagaaacataacactagagacagtttgccatgacccaagctcccctaccatgactttattctggaa
gatgctgcttctccaaagtgcattatgaaggaaaaaaaaagcctggtgagactttctcatgtgttctctgtagctctgatgagtgc
atgacaacatcatcttctcagaagaatataacaccagcaatcctgacttgttctgtagtcatatttcaagtacaggcatcagcctcct
gccaccactgggagttgcatatctgtcatcatcatcttctaccagcaaaagggtgttctctcctagcagccctcagacctcagtgg
ttagcagagaaattccagatccagcaaatagcacttgcgctaagaaatatccattgcagaggagaagacacagctgcccttg
gacaggctcctgatagactggcccacgcctgaagatcctgaaccgctgggtcatcagtgaagtccttcatcaagtgacccagtttt
cagacatccccctgctccaactggccacaaaagggaaggaatccaaggtcatcaggcctctgagaaagacatgatgcaca
gtgcctcaagcccaccacctccaagagctctccaagctgagagcagacaactgggtgatctgtacaagggtgctggagagcagg
ggctccgacccaaagccagaaaaccagcctgtccctggacgggtgctcccagcaggtgaccttcccaccatgatggctactta
ccctccaacatagatgacctccccctacatgaggcacctctcgtgactctctggaagaactggagcctcagcacatctcccttct
gtttccctcaagttctcttaccacctcacttctcctgtggtgataagctgactctggatcagttaaagatgaggtgtgactccctc
atgctctga

aTGFbR-1-1412, SEQ ID NO:3

atgggttggtcctgcatcatcctgtttctcgtggccaccgccaccggcgtgcactccgaaattgtgttgacacagtctccagccac
cctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttcgcagctacttagcctggtaccaacag
aaacctggccaggtcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtgaggagtgagg
tctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcct
ccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaaagtggagggggcggttcacagctgcaggtgcaggagtcgggccc
ggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggtccatcagcaacagtatttctcctggggctg
gatccgccagccccaggggaagggactggagtggtgggagtttctattatggtgaaaaaacctactacaacccgtccctcaa
gagccgagccaccatattcattgacacgtccaagagccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccgagacacggctgt
gtattactgtccgagagggcctactatgattcggggagttatagactcctggggccaggggaaccctggtgACGgtgTCGT
CGGGGGGCGGGGGGAGTcagGTGcagCTGgtgcagTCCGGAgccgagGTAAagaagCCAg
gcGCTTCCGTCAAGgtgTCATGCaagGCCTCAGGCTACACCttcACAAGCtattacatccact
gggtgcgcaaGCTCCCGGTcagGGCTTGgagtggtatcGGGtgcATTtacCCAGGGaagGTCAA
CACAAactacaacgagAAGttcaagGATcggGCAaccctgaccGTGgacACATCCatcTCTaccGCC
tacatgGAGCTGTACGCCTGCGCTCTgatGACaccGCAgtgtacttctgtaccAGGAGTcactac
GGCCTGgactggAACTTTgatgtctggGGCCAGGGAaccaccgtgACGgtgtccAGTGTGGAG
GGCGGTAGTggcggcTCTGGTGGGtccGGAGGCTCAggcGGCgtgatgGATgacATTcaga
tgaccagAGTCCCTCCtccCTCtccGCTTCCgtcggaGACCGCgtgaccatcACTTGTcagccT
CAcagaatatctacgtgtggCTGAACtggtagCAAcagaagCCCGGCaaggccccAAAGctgCTTATC
TATAAAGCGTCCaacCTCCACACGGGAGTCCCTTCCCGCttcTCCGGATCCGGCA
GTGGGACGGACTTCACACTCacaatcTCGtcgCTGcagCCAGAGgacTTTGCgacGTACT
actgccagcagGGCCAGacctaccaTATACTttcGGCGGCgggACCaaggtggagATTaagtaa

aTGFbR-3-1412, SEQ ID NO:4

atgggttggtcctgcatcatcctgtttctcgtggccaccgccaccggcgtgcactccgaaattgtgttgacacagtctccagccac
cctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagaagtttcttagcctggtaccaacaga
aacctggccaggtcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtgaggagtgagg
gtctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcc
tccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaaagtggagggggcggttcacagctacagctgcaggagtcgggccc
aggactggtgaagccttcggagaccctatccctcacctgcactgtctctggtgggtccatcagcagtagtagttactcctggggct
ggatccgccagccccaggggaaggcctggagtggtgggagtttctattacagtgggatcacctactacagccctgcctcaa
gagtcgaattatcatatccaagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagttctgtgaccgccgagacacggctgtg
tattactgtgcgagcgggttactatgattcggggagcccttgactactggggccaggggaaccctggtgACGgtgTCGTC

GGGGGGCGGGGGGAGTcagGTGcagCTGgtgcagTCCGGAGccgagGTAaagaagCCAgg
cGCTTCCGTCAAGgtgTCATGCaagGCCTCAGGCTACACCttcACAAGCtattacatccactg
ggtgcgccaGCTCCCGGTcagGGCTTGgagtggatcGGGtgcATTtacCCAGGGaacGTCAAC
ACAAactacaacgagAAGttcaagGATcggGCAaccctgaccGTGgacACATCCatcTCTaccGCCta
catgGAGCTGTACGCCTGCGCTCTgatGACaccGCAgtgtacttctgtaccAGGAGTcactacG
GCCTGgactggAACTTTgatgtctggGGCCAGGGAaccaccgtgACGgtgtccAGTGTGGAGG
GCGGTAGTggcggcTCTGGTGGGtccGGAGGCTCAggcGGCgtgatgGATgacATTcagatg
accagAGTCCCTCCtccCTCtccGCTTCCgtcggaGACCGCgtgaccatcACTTGTcagccTC
AcagaatatctacgtgtggCTGAACtggtacCAAcagaagCCCGGCaaggccccAAgctgCTTATCT
ATAAAGCGTCCaacCTCCACACGGGAGTCCCTTCCCGCttcTCCGGATCCGGCAG
TGGGACGGACTTCACACTCacaatcTCGtcgCTGcagCCAGAGgacTTTGCGacGTACta
ctgccagcagGCCAGacctacccaTATACTttcGGCGGCgggACCaaggtggagATTaagtaa

CD86-PD-L1, SEQ ID NO:5

Atggatccccagtgactatgggactgagtaacattctctttgtgatggccttctgctctctggtgctgctcctctgaagattcaag
cttatttcaatgagactgcagacctgccatgccaatttgcaactctcaaaaccaaagcctgagtgcagtagtagtattttggcagg
accagggaaaacttggctctgaatgaggtatacttaggcaaagagaaatttgacagtgttcattccaagtatatgggccgcacaagtt
ttgattcggacagttggaccctgagacttcacaatcttcagatcaaggacaaggccttgatcaatgtatcatccatcacaaaaagc
ccacaggaatgattcgcatccaccagatgaattctgaactgtcagtgcttgctaacttcagtaacctgaatagtaacatttctaa
tataacagaaaatgtgtacataaatttgacctgctcatctatacacggttaccagaaacctaagaagatgagtggtttgctaagaacc
aagaattcaactatcgagtatgatggtattatgcagaaatctcaagataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgctgtg
ttcattccctgatgttacgagcaatatgaccatcttctgtattctggaaactgacaagacgcggttttatcttcacctttctatagag
cttgaggacctcagcctccccagaccacattctggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCgg
cGGCggcTCGtttactgtcacggttccaaaggacctatatgtggtagagtatggtagcaatatgacaattgaatgcaaattccc
agtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatggaggataagaacattatcaatttggcatggagagga
agacctgaagggtcagcatagtagctacagacagagggcccggtgtgaaggaccagctctccctgggaaatgctgcacttca
gatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatgacagctatggtggtgccgactacaagcgaattactgtg
aaagtcaatgccccatacaaaaaatcaacaaaagaattttggtgtggtatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggc
tgagggtaccccaaggccgaagtcatctggacaagcagtgaccatcaagtcctgagtggtgaagaccaccaccaccaattcca
agagagaggagaagcttttcaatgtgaccagcacactgagaatcaacacaactaatgagatttttactgcacttttaggaga
ttagatcctgaggaaaaccatacagctgaattggtcatccagaactacctctggcacatcctccaatgaaaggTAA

5

CD86-PD-L2, SEQ ID NO:6

Atggatccccagtgactatgggactgagtaacattctctttgtgatggccttctgctctctggtgctgctcctctgaagattcaag

10

cttatttcaatgagactgcagacctgccatgccaatgtgcaaactctcaaaaccaaagcctgagtgagctagtagtattttggcagg
accaggaaaacttgggtctgaatgaggtatacttaggcaaagagaaatttgacagtgttcattccaagtatatgggccgcacaagtt
ttgattcggacagttggacctgagacttcacaatcttcagatcaaggacaagggcttgatcaatgtatcatccatcacaaaaagc
ccacagggaatgattcgcacccaccagatgaattctgaactgtcagtgcttgtaacttcagtaacctgaaatagtagtaatttctaa
tataacagaaaatgtgtacataaatttgacctgctcatctatacacggttaccagaacctaaagaatgagtggttttgctaagaacc
aagaattcaactatcgagtatgatgtattatgcagaaatctcaagataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgctgt
ttcattccctgatgttacgagcaatatgaccatcttctgtattctggaaactgacaagacgcggctttatcttcacctttctatagag
cttgaggacctcagctccccagaccacattcctggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCgg
cGGCggcTCGTtattcacagtgcagtccttaaggaactgtacataatagagcatggcagcaatgtgacctggaatgcaa
ctttgacactggagtgatgtgaaccttgagcaataacagccagtttgcaaaaggtggaaaatgatacatccccacacctgtaa
agagccactttgctggaggagcagctgccccagggaaggcctcgttcacataacctcaagtccaagtgagggacgaaggaca
gtaccaatgcataatcatctatggggtcgcctgggactacaagtacgtgactctgaaagtcaaagcttctacaggaaaataaca
ctcacatcctaaaggtccagaaacagatgaggtagagctcacctgccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcctggcc
aaacgtcagcgttctgccaacaccagccactccaggacctgaaggcctctaccaggtcaccagtggttctgcgcctaaagcc
acccctggcagaaactcagctgtgttctggaatactcacgtgaggggaacttacttggccagcattgaccttcaaagtcagat
ggaaccaggacctccaactTAA

CD80-PD-L1, SEQ ID NO:7

atgggccacacacggaggcaggggaacatcacatccaagtgtccataacctcaatttctttcagctcttggctgctggctgtctttct
cacttctgttcaggtgttatccagctgaccaaggaagtgaagaagtggcaacgctgtcctgtggtcacaatgtttctgttgaagag
ctggcacaactcgcactactggcaaaaggagaagaaaatgggtgctgactatgatgtctggggacatgaatatatggcccgagt
acaagaaccggaccatctttgatacactaataacctctccattgtgatcctggctctgcgccatctgacgagggcacatacagat
gtgttgttctgaagtatgaaaaagacgcttcaagcgggaacacctggctgaagtacgttatcagtaaaagctgacttcctaca
cctagtatatctgactttgaaattccaacttctaattagaaaggataatttgcacacctctggagggtttccagagcctcacctctct
ggttggaaaatggagaagaattaaatgccatcaacacacagtttccaagatcctgaaactgagctctatgctgttagcagcaaa
ctggatttcaatatgacaaccaaccacagcttcatgtgtctcatcaagtatggacatttaagagtgaatcagaccttcaactggaata
caaccaagcaagagcatttctgataacggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCg
gcTCGttactgtcacggttccaaggacctatatgtggtagagtagtagcaatatgacaattgaatgcaattcccagtagaa
aaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatggaggataagaacattattcaatttgcagtgagaggaagacctg
aaggttcagcatagtagctacagacagagggccggctgtgaaggaccagctctccctgggaaatgctgcacttcagatcaca
gatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatgatcagctatgggtggccgactacaagcaattactgtgaaagta
atgccccatacaaaaaatcaaccaagaatttgggtgtggtaccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagggc
taccacaaggccgaagtcacttgacaagcagtgaccatcaagtcctgagtggtgaagaccaccaccaccaattccaagagaga
ggagaagcttttcaatgtgaccagcacactgagaatcaacacaacaactaatgagattttctactgcacttttaggagattagatcct

gaggaaaaccatacagctgaattggatcccagaactacctctggcacatcctccaaatgaaaggTAA

CD80-PD-L2, SEQ ID NO:8

atgggccacacacggaggcagggaacatcaccatccaagtgtccatacctcaatttcttcagctcttggtgctggctggtctttct
cacttctgttcaggtgttatccacgtgaccaaggaagtgaagaagtggcaacgctgtcctgtggtcacaatgtttctgttgaagag
ctggcaciaaactcgcactctactggcaaaaggagaagaaaatgggtgctgactatgatgtctggggacatgaatatatggcccagat
acaagaaccggaccatctttgatatacctaataacctctccattgtgatcctggctctgcgcccacatgacgagggcacatacagat
gtgtgttctgaagtatgaaaaagacgctttcaagcgggaacacctggctgaagtacgttatcagtcacaaagctgacttcctaca
cctagtatatctgactttgaaattccaacttctaattattagaaggataatttgcacacctctggagggtttccagagcctcacctctct
gggttgaaaatggagaagaattaaatgccatcaacacaacagtttccaagatcctgaaactgagctctatgctgttagcagcaaa
ctggattcaatatgacaaccaaccacagcttcatgtgtctcatcaagtatggacatttaagagtgaatcagaccttcaactggaata
caaccaagcaagagcattttcctgataacggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCg
gcTCGTattcacagtacagtccttaaggaactgtacataatagagcatggcagaatgtgacctggaatgcaacttgac
actggaagtcatgtgaaccttgagcaataacagccagtttgcaaaagggtgaaaatgatacatccccacaccgtgaaagagcc
actttgctggaggagcagctgcccctaggggaaggcctcgtccacatacctcaagtccaagtgaaggacgaaggacagtacca
atgcataatcatctatggggcgcctgggactacaagtacctgactctgaaagtcaaagcttctacaggaaaataaacactcaca
tcctaaagggtccagaacagatgaggtagagctcacctgccaggctacaggttatcctctggcagaagtatcctggccaaacgt
cagcgttctgccaacaccagccactccaggaccctgaaggcctctaccaggtcaccagtggttctgcgcctaaagccaccccc
tggcagaaacttcagctgtgtgttctggaatactcacgtgagggaacttactttggccagcattgacctcaaagtcagatggaacc
caggacctatccaactTAA

5

PD-L1-CD86, SEQ ID NO:9

atgaggatatttctgtctttatattcatgacctactggcatttctgaacgcatttactgtcacggttccaaggacctatatgtgga
gagtatggtagcaatatgacaattgaatgcaattccagtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatg
gaggataagaacattattcaatttctgcatggagaggaagacctgaagggtcagcatagtagctacagacagagggcccggtg
ttgaaggaccagctctccctgggaaatgctgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatga
tcagctatggtggtgccgactacaagcgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaaaaaatcaacaaagaattttggttgtg
gatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagggctacccaaggccgaagtcatctggacaagcagtgaccat
caagtcctgagtggaagaccaccaccaccaattccaagagagaggagaagctttcaatgtgaccagcacactgagaatcaac
acaacaactaatgagattttctactgcacttttaggagattagatcctgaggaaaaccatacagctgaattggtcatcccagaactac
ctctggcacatcctccaaatgaaaggggcGGAGGGGGAagtggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCggc
TCGggtgctgctcctctgaagattcaagcttatttcaatgagactgcagacctgccatgccaatttgcaactctcaaaacaaa
gcctgagtgagctagtagtattttggcaggaccaggaaaacttggttctgaatgaggtatacttaggcaaaagagaaatttgacagt

10

gttcattccaagtatatgggcccgcacaagtttgattcggacagttggaccctgagacttcacaatcttcagatcaaggacaaggg
 cttgtatcaatgtatcatccatcacaaaaagcccacaggaatgattcgcacccagatgaattctgaactgtcagtgccttgctaac
 ttcagtcaacctgaaatagtaccaatttctaataaacagaaaatgtgtacataaattgacctgctcatctatacagggttaccaga
 acctaagaagatgagtgcttgtaagaaccaagaattcaactatcgagtatgatgggtattatgcagaaatctcaagataatgtcaca
 gaactgtacgacgtttccatcagcttgctgtttcattccctgatgttacgagcaatatgaccatcttctgtattctggaaactgacaag
 acgcggcttttatcttcacctttctctatagagcttgaggaccctcagcctccccagaccacattcctTAA

PD-L1-CD80, SEQ ID NO:10

atgaggatatttgctgtctttatattcatgacctactggcatttgctgaacgcatttactgtcacgggtcccaaggacctatatgtgta
 gagtatggtagcaatatgacaattgaatgcaaattcccagtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctattgggaaatg
 gaggataagaacattattcaatttgcatggagaggaagacctgaaggttcagcatagtagctacagacagagggcccggctg
 ttgaaggaccagctctccctgggaaatgctgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgtgcatga
 tcagctatgggtggcgcactacaagcgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaacaaatcaacaaagaatttgggtgtg
 gatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagggctaccccaaggccgaagtcatctggacaagcagtgaccat
 caagtctgagtggttaagaccaccaccaccaattccaagagagaggagaagctttcaatgtgaccagcacactgagaatcaac
 acaacaactaatgagattttactgcacttttaggagattagatcctgaggaaaaccatacagctgaattggatcccagaactac
 ctctggcacatctccaaatgaaagggcGGAGGGGGAagtggcGGGGTgggtccGGCggcGGCggc
 TCGtcttttctactctgttcaggtgttatccacgtgaccaaggaagtgaagaagtggcaacgctgtcctgtgtgcacaatgtttc
 tgttgaagagctggcacaaactcgcatctactggcaaaaggagaagaaaatgggtgctgactatgatgtctgggacatgaatata
 tggcccgagtacaagaaccggaccatcttgatatacctaataacctctccattgtgatcctggctctgcgccatctgacgaggg
 cacatacagtggtgtgttctgaagtatgaaaagacgctttcaagcgggaacacctggctgaagtgcgttatcagtcaaagctg
 acttccctacacctagtatatctgacttgaattccaacttctaataattagaaggataattgctcaacctctggagggtttccagagc
 ctcacctctcctggttgaaaaatggagaagaattaaatgccatcaacacaacagtttccaagatcctgaaactgagctctatgctg
 ttagcgcaaaactggatttcaatatgacaaccaaccacagcttcattgtgtctcatcaagtatggacatttaagagtgaatcagacct
 caactggaatacaaccaagcaagagcatttctgataacTAA

5

PD-L2-CD86, SEQ ID NO:11

atgatcttctcctgctaattgttgagcctgggaattgcagcttcaccagatagcagctttattcacagtgcagtccttaaggaactgt
 acataatagagcatggcagcaatgtgacctggaatgcaactttgacactggaagtcattgtgaacctggagcaataacagccag
 tttgcaaaagggtggaaaatgatacatccccacaccgtgaaagagccactttgctggaggagcagctgcccttagggaaaggcctc
 gtccacatactcaagtccaagtggggacgaaggacagtaccaatgcataatcatctatggggctgcctgggactacaagtagc
 ctgactctgaaagtcaaagcttctacaggaaaataaacactcacatcctaaaggtccagaaacagatgaggttagagctcacct
 gccaggctacagggttatctctggcagaagtatcctggcgaacgtcagcgttctgccaacaccagccactccaggaccctg
 aaggcctctaccaggtcaccagtggttctgcgcctaaagccacccctggcagaaactcagctgtgtgttctggaatactcacgtg

10

aggggaacttactttggccagcattgaccttcaaagtcagatggaaccaggaccatccaactggcGGAGGGGGAagt
ggcGGGGGTgggtccGGCggcGGCggcTCGggtgctgctcctctgaagattcaagcttattcaatgagactgca
gacctgccatgccaatgtgcaaactctcaaaaccaaagcctgagttagtagtagtatttggcaggaccaggaaaacttggtct
gaatgaggtatacttaggcaaagagaaattgacagtgttcatccaagtatatgggccgcacaagtttgattcggacagtggac
cctgagacttcacaatcttcagatcaaggacaagggcttgatcaatgtatcatccatcacaaaaagcccacagggaatgattcgca
tccaccagatgaattctgaactgtcagtgttgtaacttcagtcaacctgaaatagtagtaccatttctaataacagaaaatgtgtac
ataaatttgacctgctcatctatacacggttaccagaacctagaagatgagtgtttgctaagaaccaagaattcaactatcgagt
atgatggtattatgcagaaatctcaagataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgtctgtttcattccctgatgttacga
gcaatatgaccatctctgtattctggaaactgacaagacggcgttttatcttcacettctctatagagcttgaggaccctcagcct
ccccagaccacattcct

scFv (VK-VH) anti-hPD-L1

5 12A4, SEQ ID NO:12

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRN
WPTFGQGTKVEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSTYAI
WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED
TAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTTTVTVSS

10 13G4, SEQ ID NO:13

MGWSCILFLVATATGVHSAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQ
QKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY
PFTFGPGTKVDIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGITFDDYGMH
WVRQAPGKGLEWVSGISWNRGRIEYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE
DTALYYCAKGRFRYFDWFLDYWGQGLTVTVSS

1B12, SEQ ID NO:14

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
QKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRN
WPTFGQGTKVEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSSYAI
WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGRAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED
TAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVWGQGTTTVTVSS

10A5, SEQ ID NO:15

MGWSCIIIFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY
 QKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN
 SYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYD
 VHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSL
 RSED TAVYYCARERIQLWFDYWGQGT LVTVSS

3G10, SEQ ID NO:16

MGWSCIIIFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLVWYQ
 QKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSN
 WPRTFGQGTKVEIKSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYG
 FSWVRQAPGQGLEWMGWITAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTVYMELRS
 LRSDDTAVYYCARDYFYGMDVWGQGT TTVTVSS

5

scFv (VH-VL) anti-hCD28, SEQ ID NO:17

GGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWI
 GCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYFCTRSHYGL
 DWNFDVWGQGT TTVTVSSVEGGSGSGSGSGSGGVDDIQMTQSPSSLSASVGDR
 VTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK

REIVINDICACIONES

1. Un linfocito T modificado que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor, en donde la molécula interruptor comprende:
 - 5 un dominio extracelular de un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) y un dominio intracelular de un receptor de interleucina-12 (IL-12R), en donde la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con TGF-beta induce al linfocito T modificado a secretar una citocina soluble en un tumor.
- 10 2. El linfocito T modificado de la reivindicación 1, en donde:
 - i. la citocina soluble se selecciona entre el grupo que consiste en IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TNF, TGF, IFN, y fragmentos funcionales y variantes de las mismas; y/o
 - 15 ii. el tumor se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y combinaciones de los mismos; y/o
 - 20 iii. los linfocitos T modificados se dirigen a un sitio tumoral sólido o a un antígeno tumoral, siendo seleccionado dicho antígeno tumoral preferentemente del grupo que consiste en
 - a) antígeno asociado a tumores (TAA), antígeno vírico, antígeno reconocido por anticuerpos, y cualquier fragmento de los mismos y cualquier combinación de los mismos; o
 - 25 b) p53, Ras, beta-catenina, CDK4, alfa-actinina-4, tirosinasa, TRP1/gp75, TRP2, gp100, Melan-A/MART1, gangliósidos, PSMA, HER2, WT1, EphA3, EGFR, CD20, MAGE, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, telomerasa, survivina y cualquier combinación de los mismos; y/o
 - iv. el linfocito T modificado está activado.
- 30 3. Una población de células que comprende el linfocito T modificado de la reivindicación 1 o 2, en donde el linfocito T modificado se ha producido mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica la molécula interruptor en uno o más linfocitos T de la población.
- 35 4. La población de células de la reivindicación 3, en donde la población de células comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T, preferentemente en donde la población de células comprende células mononucleares de sangre periférica, más preferentemente en donde la población de células comprende una población purificada de linfocitos T.
- 40 5. La población de células de la reivindicación 4, en donde la población de células se ha activado y expandido con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 antes de la introducción del ácido nucleico que codifica la molécula interruptor.
- 45 6. Una población de linfocitos T modificados que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor que comprende un dominio extracelular de un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) y un dominio intracelular de un receptor de interleucina-12 (IL-12R), en donde la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con TGF-beta induce a los linfocitos T modificados a secretar una citocina soluble en un tumor, para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección, comprendiendo dicho método administrar dicha población de linfocitos T modificados a un sujeto.
- 50 7. La población de linfocitos T modificados para su uso como en la reivindicación 6, en donde la enfermedad o afección es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de riñón, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, melanoma metastásico, mesotelioma, neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de piel, timoma, sarcoma, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, cáncer de útero y combinaciones de los mismos.
- 55 8. La población de linfocitos T modificados para su uso como en la reivindicación 6, en donde administrar los linfocitos T modificados comprende inducir la lisis de células o tejido del tumor.
- 60 9. Un método para generar un linfocito T modificado que exprese una molécula interruptor que comprende:
 - introducir un ácido nucleico que codifica una molécula interruptor en una población de linfocitos T, en donde la molécula interruptor comprende un dominio extracelular de un receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-R) y un dominio intracelular de un receptor de interleucina-12 (IL-12R), en donde la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con TGF-beta induce a los linfocitos T a secretar una citocina soluble en un tumor, generando así el linfocito T modificado.
- 65 10. El método de la reivindicación 9, en donde

- i. la población de linfocitos T se encuentra en células seleccionadas del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica, células sanguíneas de cordón umbilical, una población purificada de linfocitos T y una línea de linfocitos T, y/o
- 5 ii. la población de linfocitos T se crioconserva, comprendiendo dicho método preferentemente además descongelar los linfocitos T crioconservados.
11. Una composición que comprende el linfocito T modificado generado según la reivindicación 9, que comprende además opcionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 10 12. Una molécula interruptor que comprende
- a) un dominio extracelular de un receptor I del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-RI), un dominio transmembrana de TGF-beta-RI y un dominio intracelular de un IL-12R-beta-1, o
- b) un dominio extracelular de un receptor II del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta-RII), un dominio transmembrana de TGF-beta-RII y un dominio intracelular de IL-12 R-beta-2,
- 15 en donde la interacción del dominio extracelular de la molécula interruptor con TGF-beta induce a un linfocito T modificado que expresa dicha molécula interruptor a secretar una citocina soluble en un tumor.

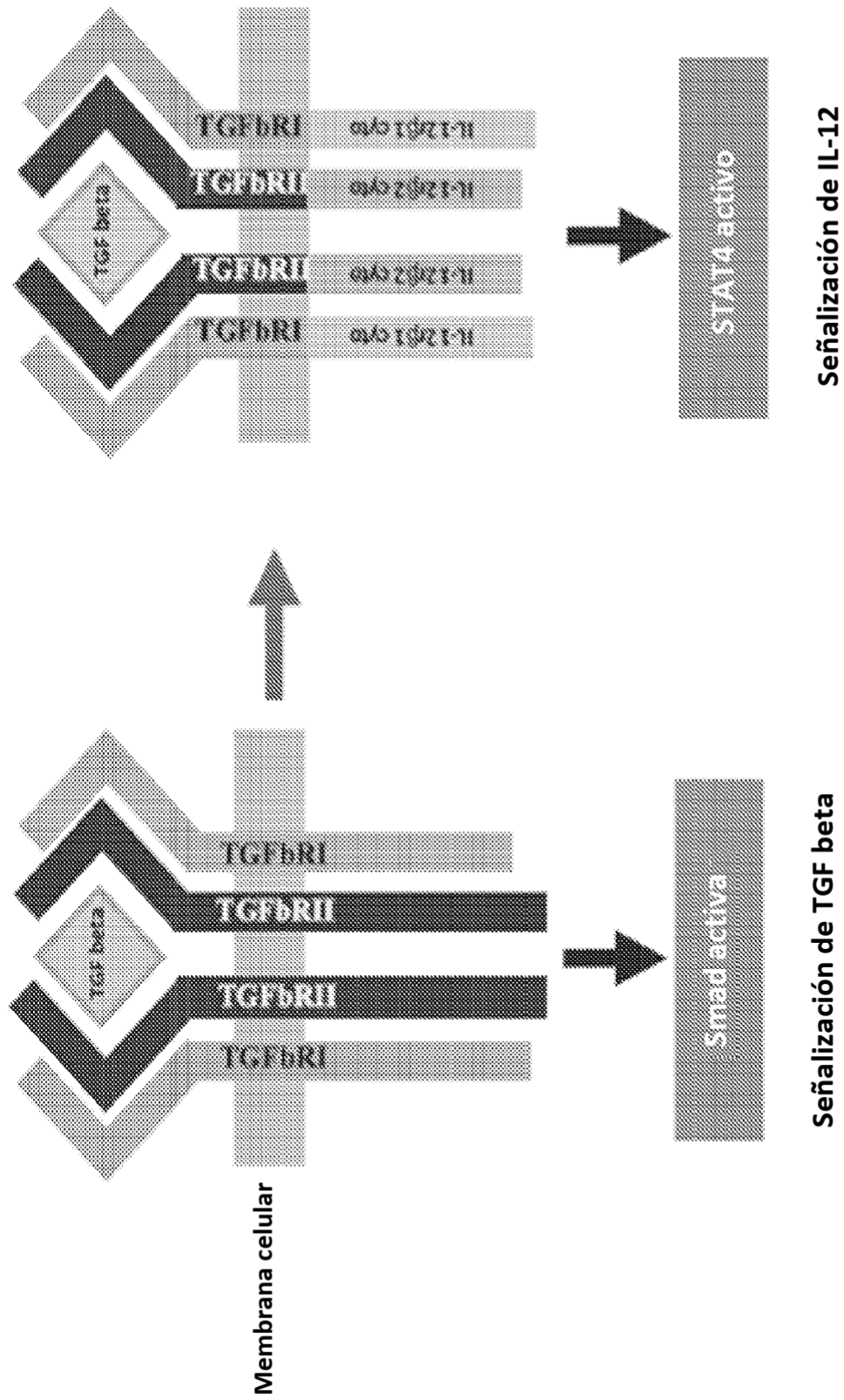
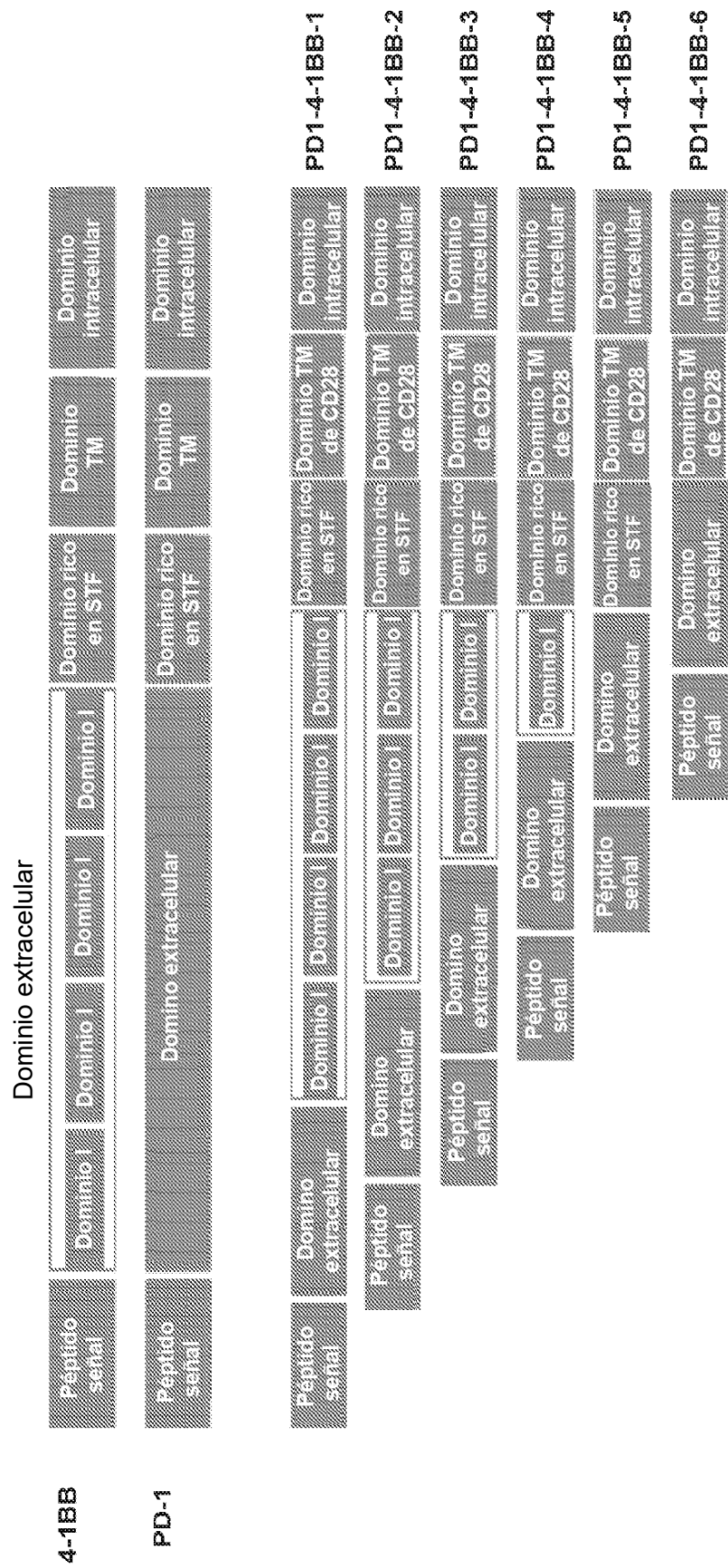


Figura 1



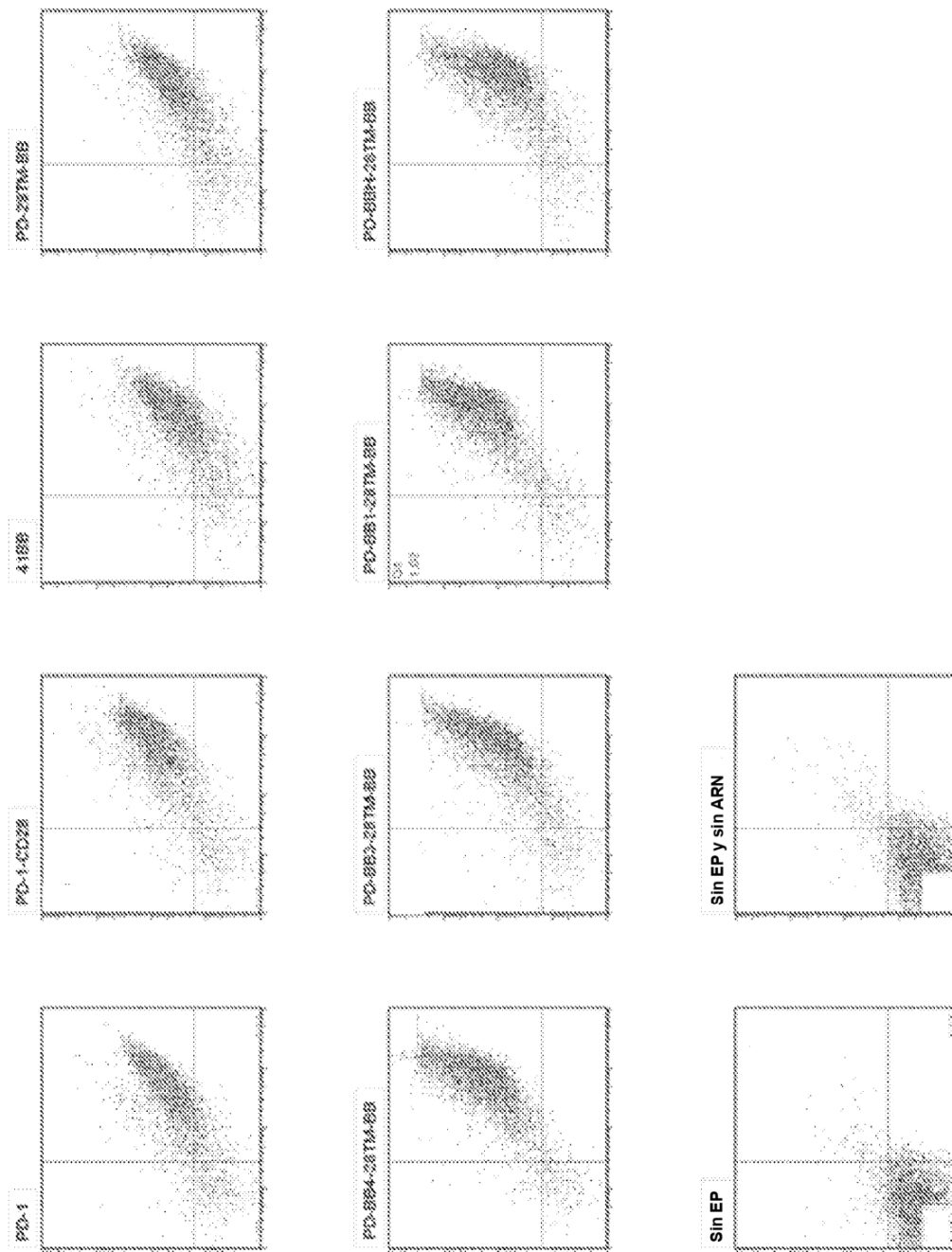


Figura 3

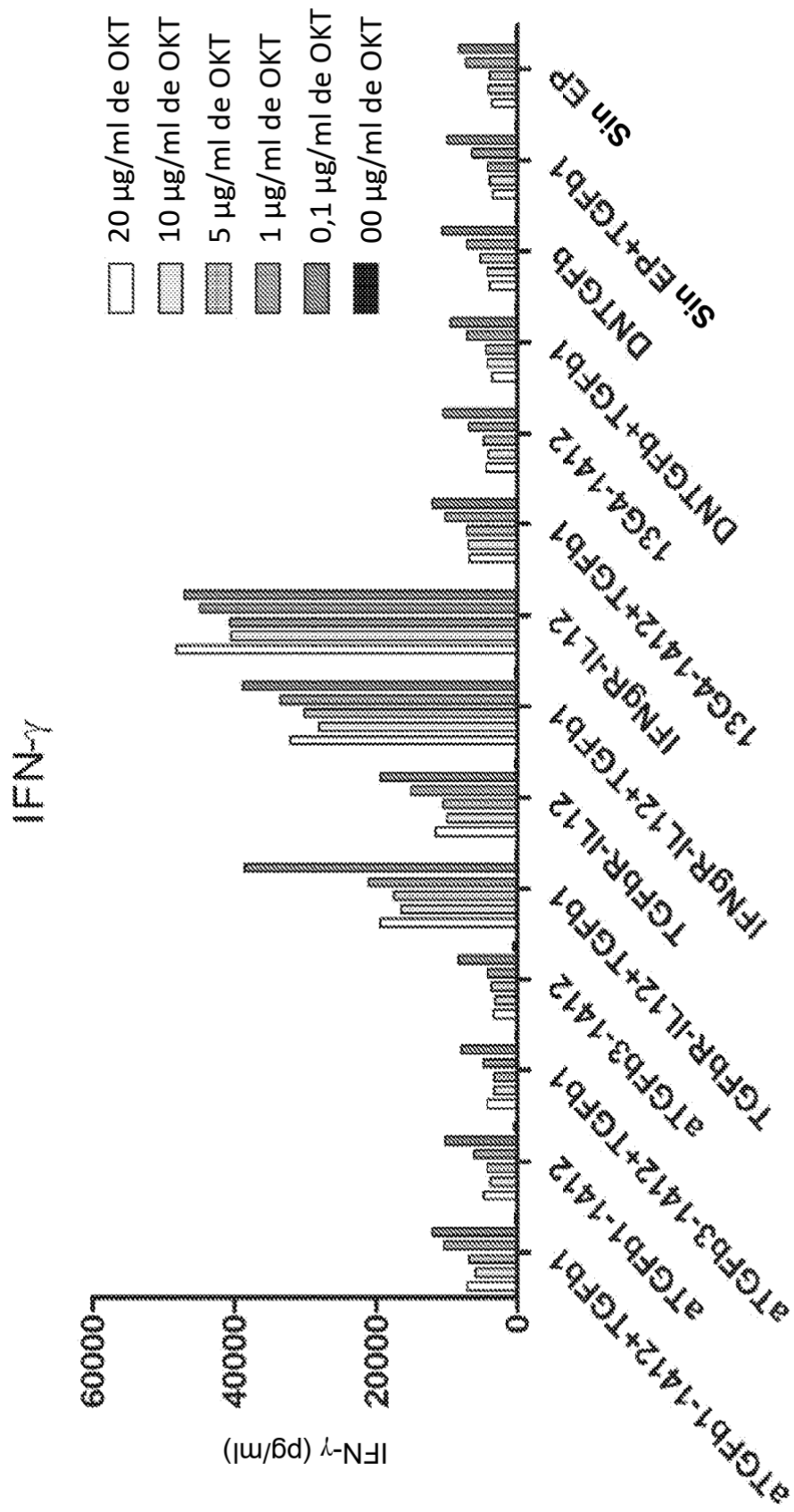


Figura 4

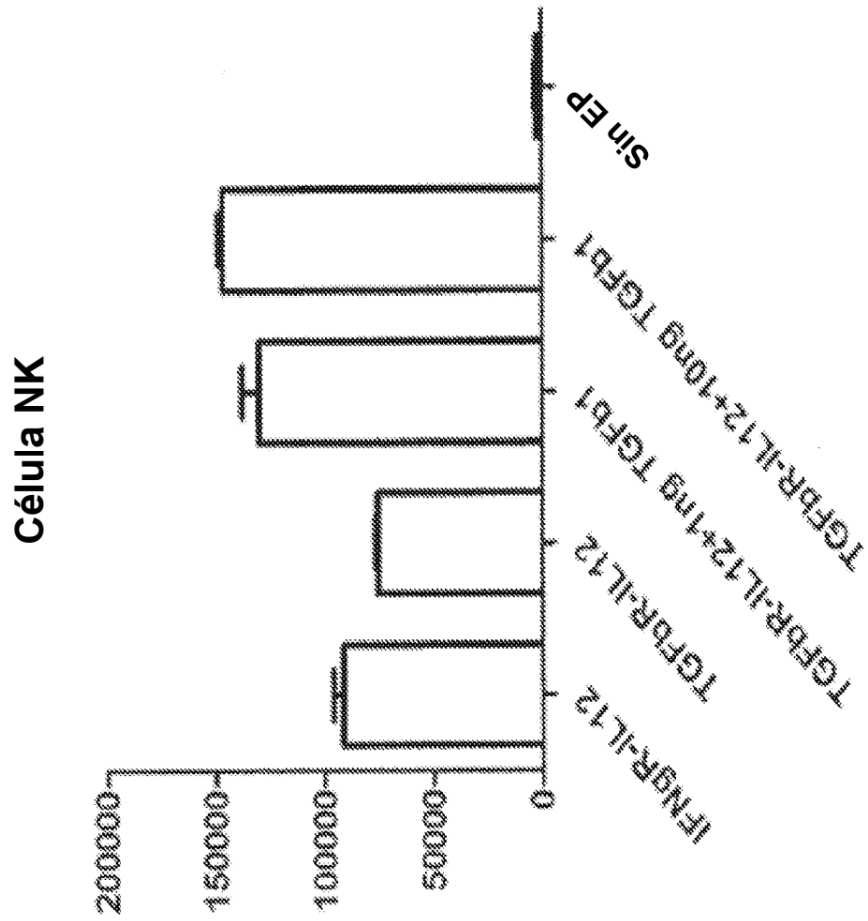


Figura 5

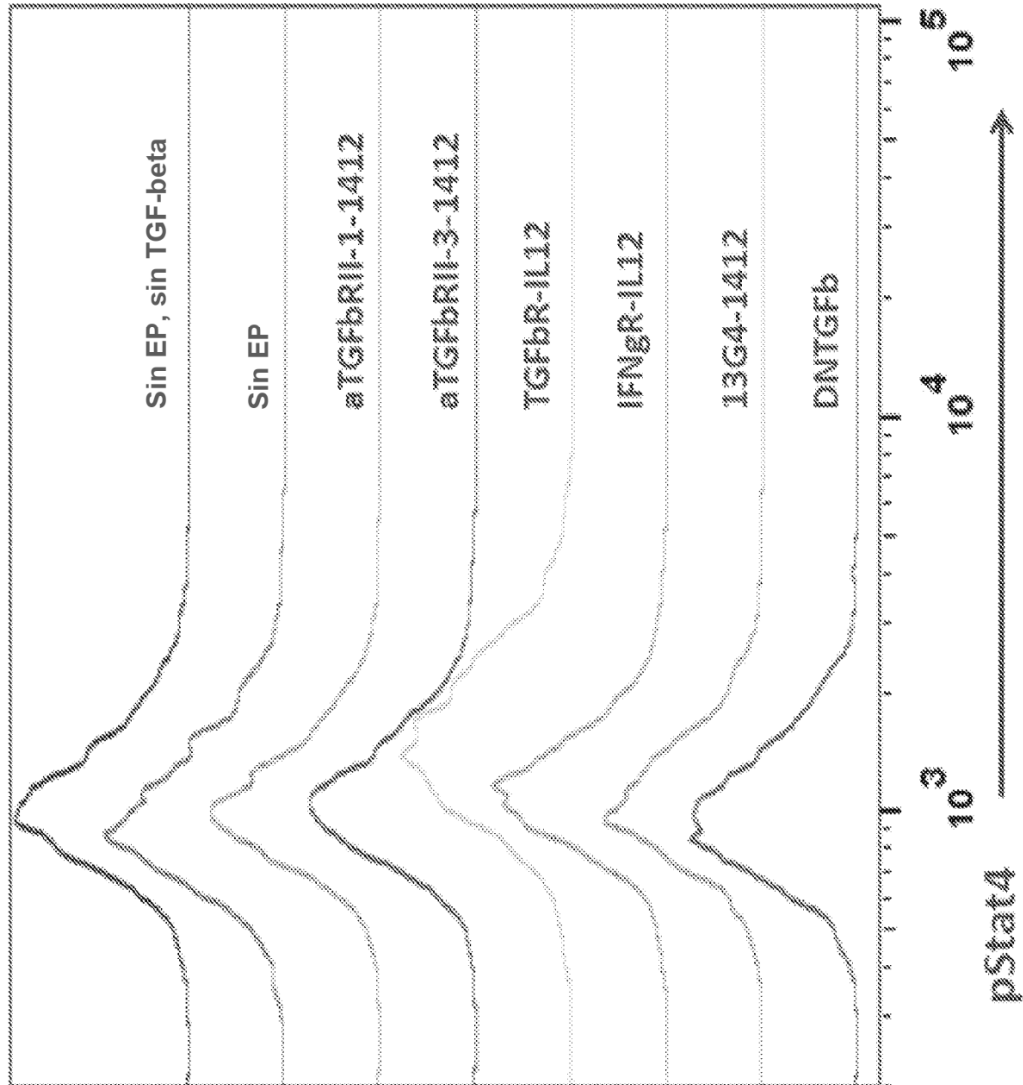


Figura 6

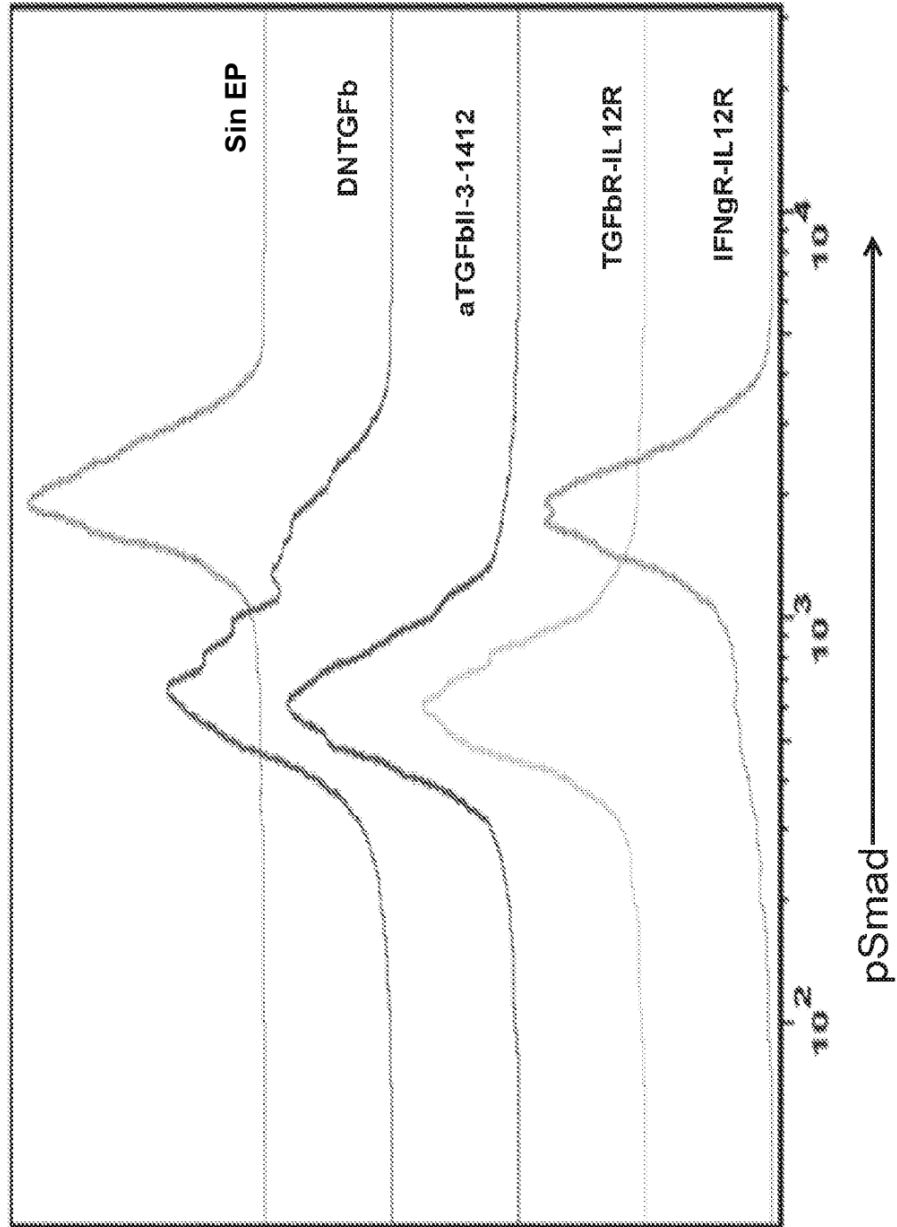


Figura 7

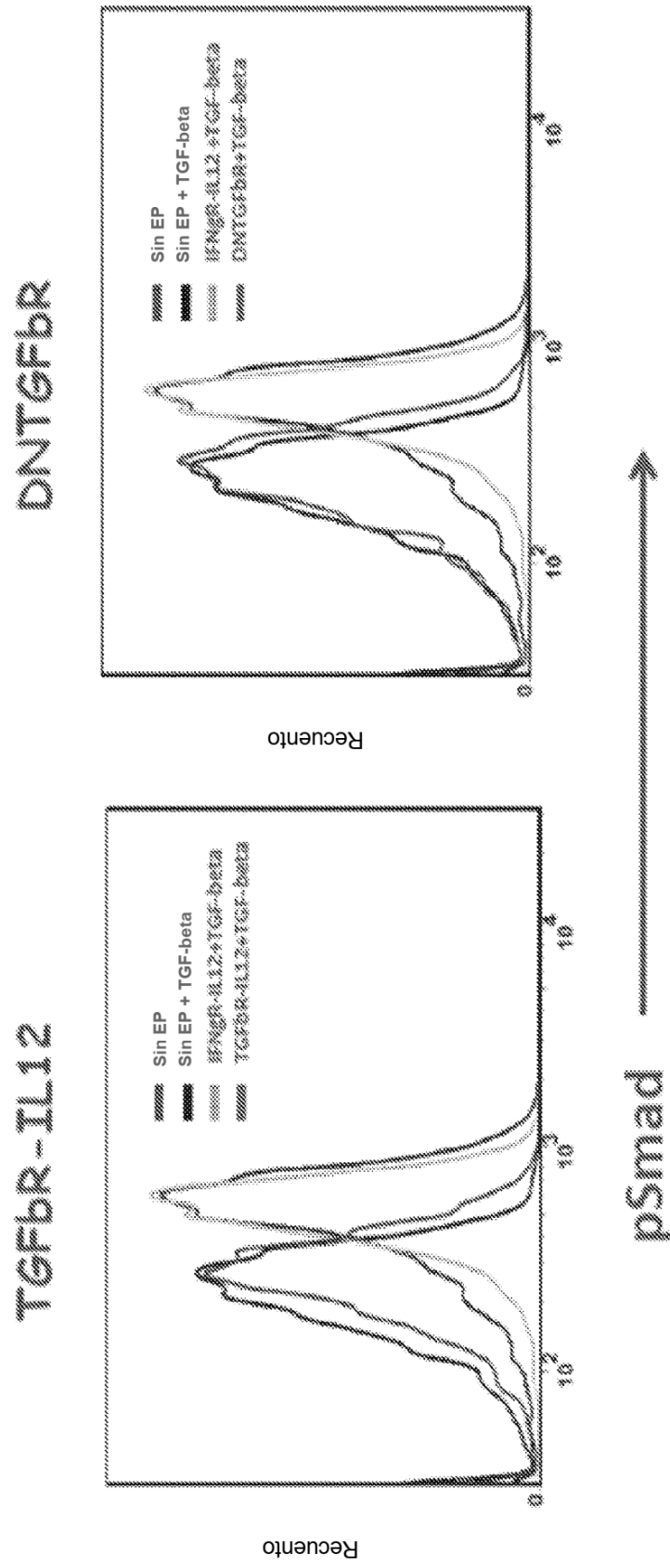


Figura 8

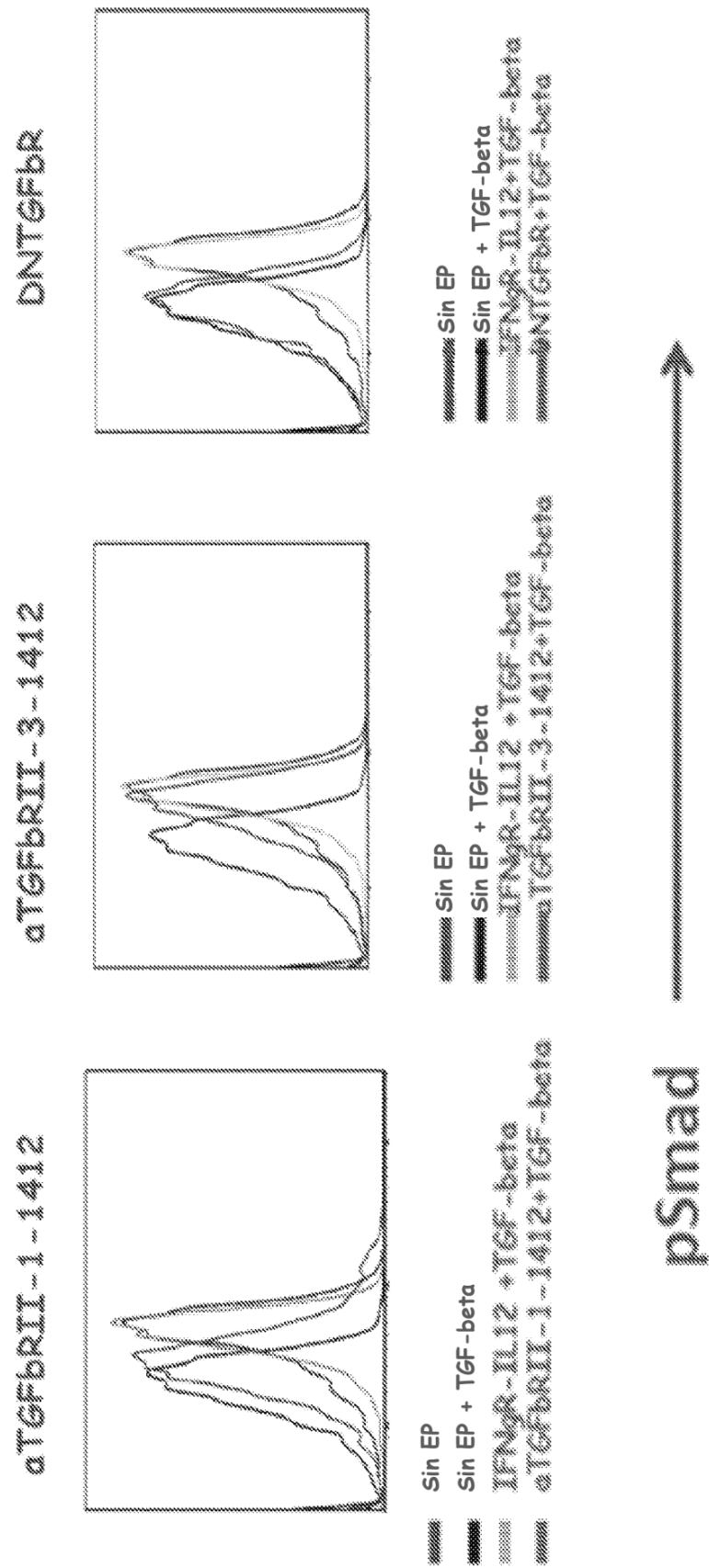


Figura 9

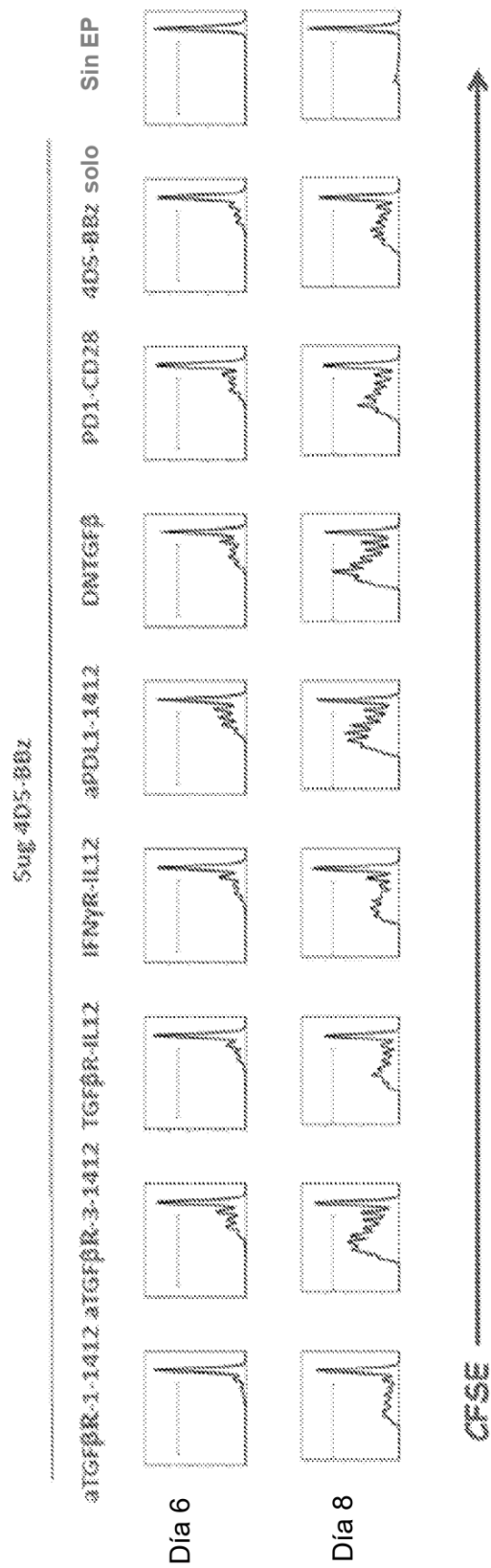


Figura 10

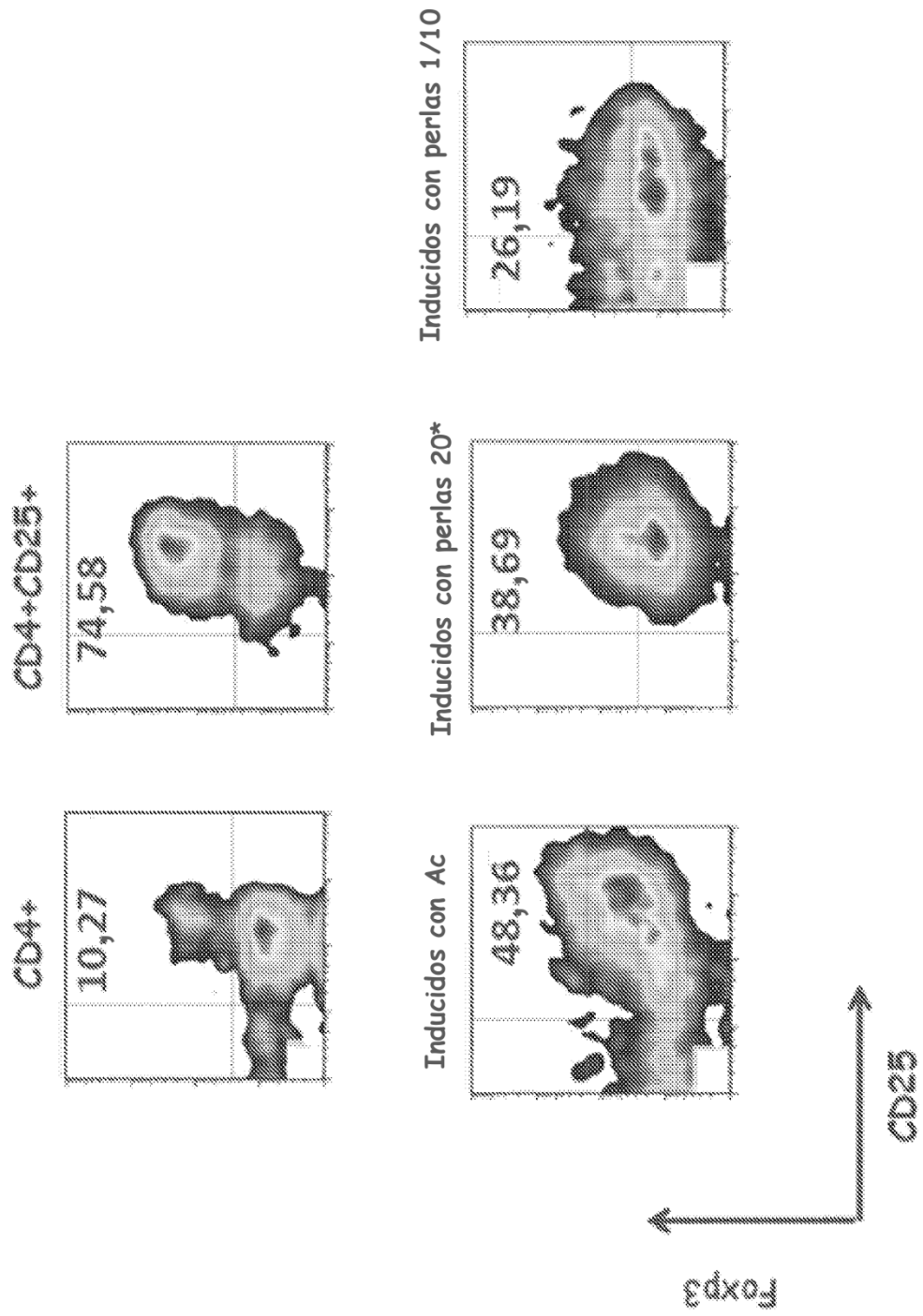


Figura 11

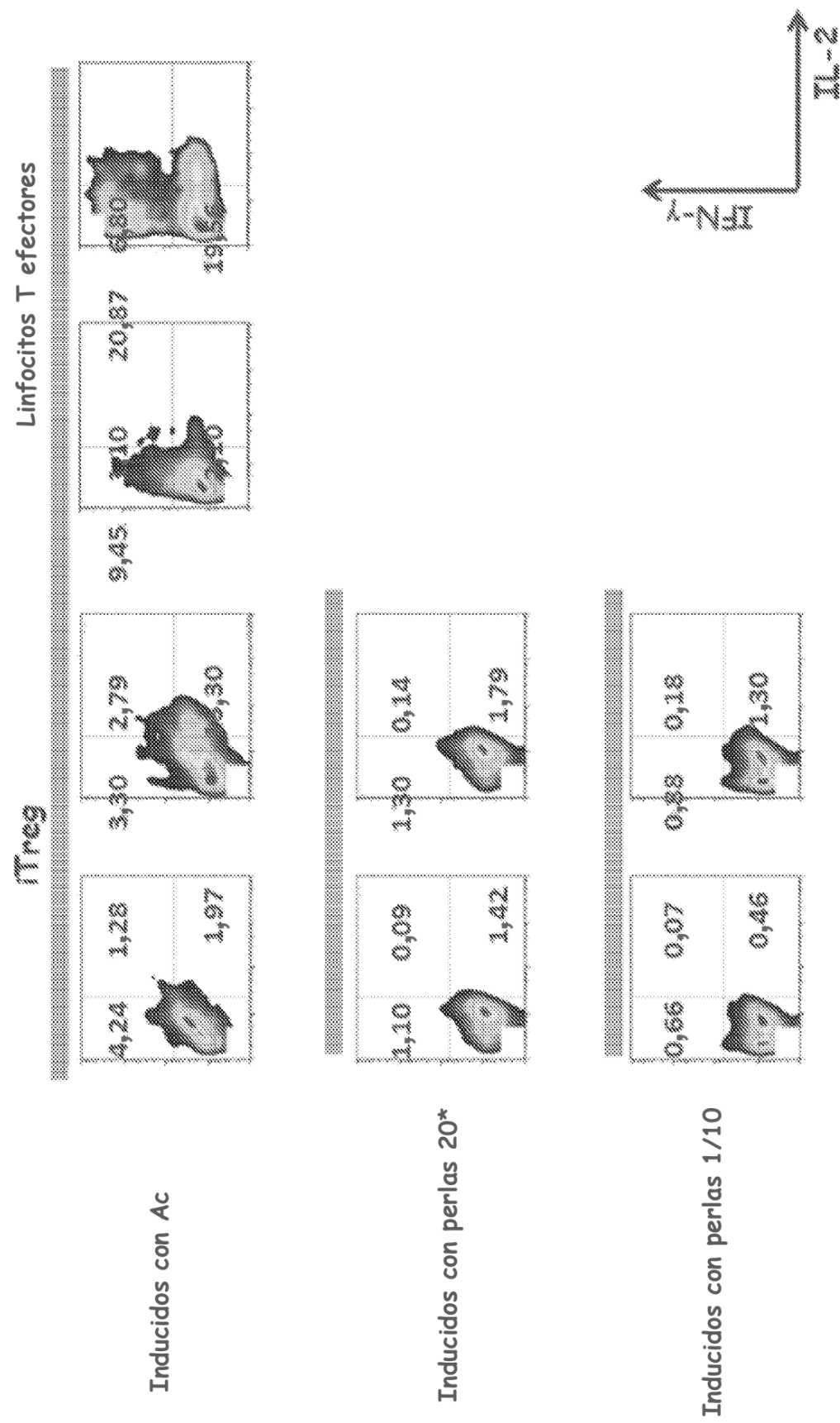


Figura 12

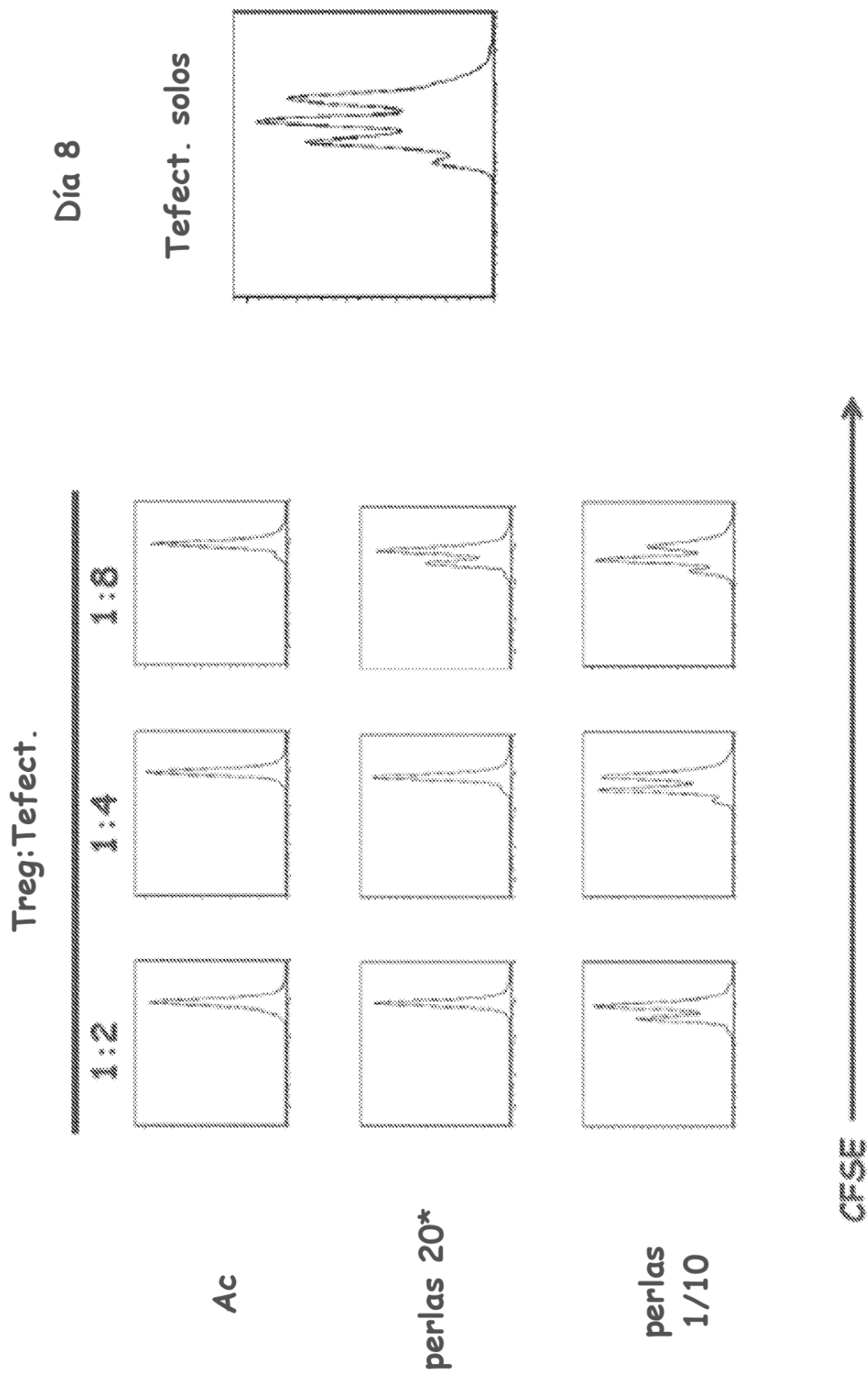


Figura 13

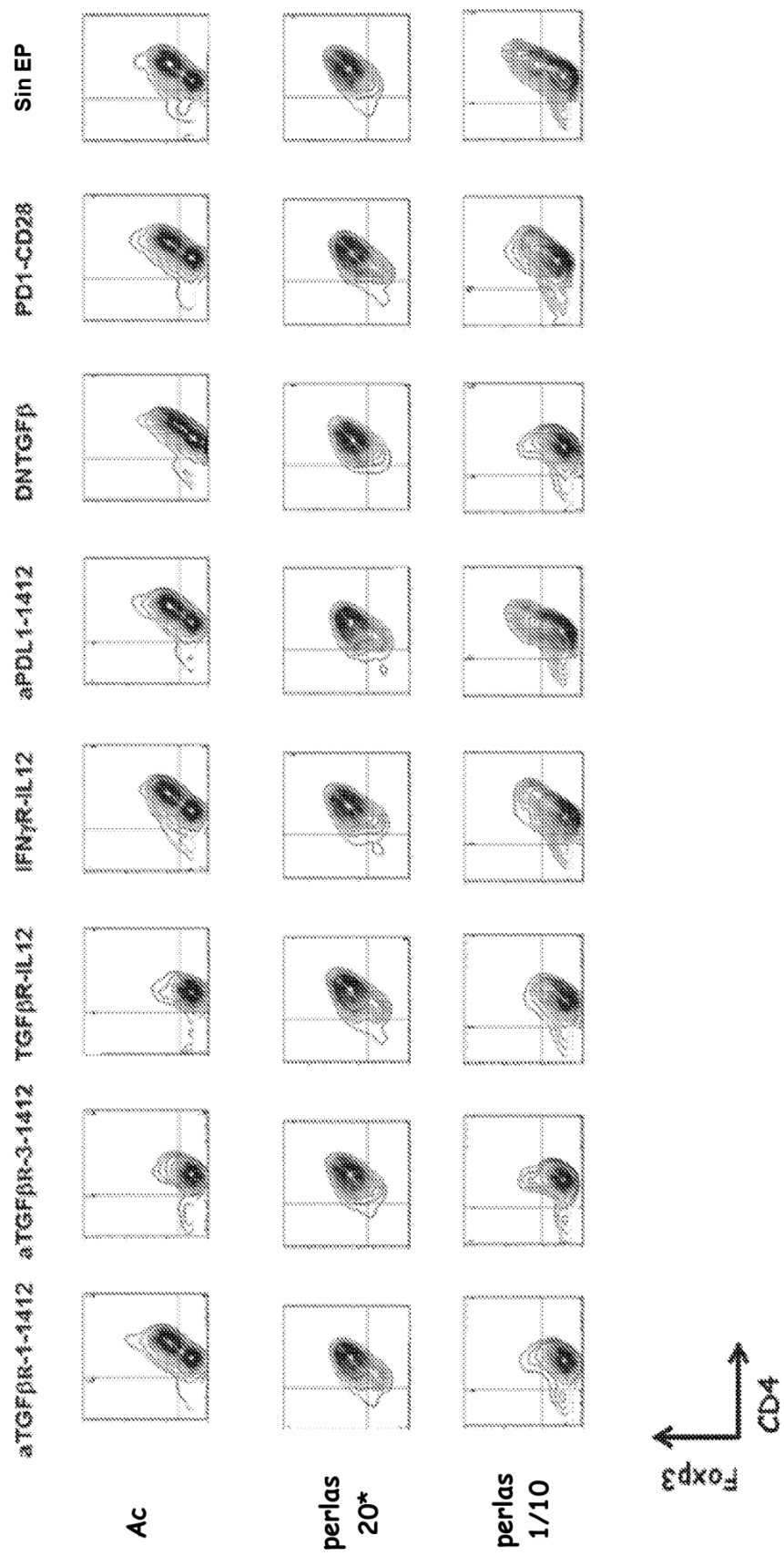


Figura 14

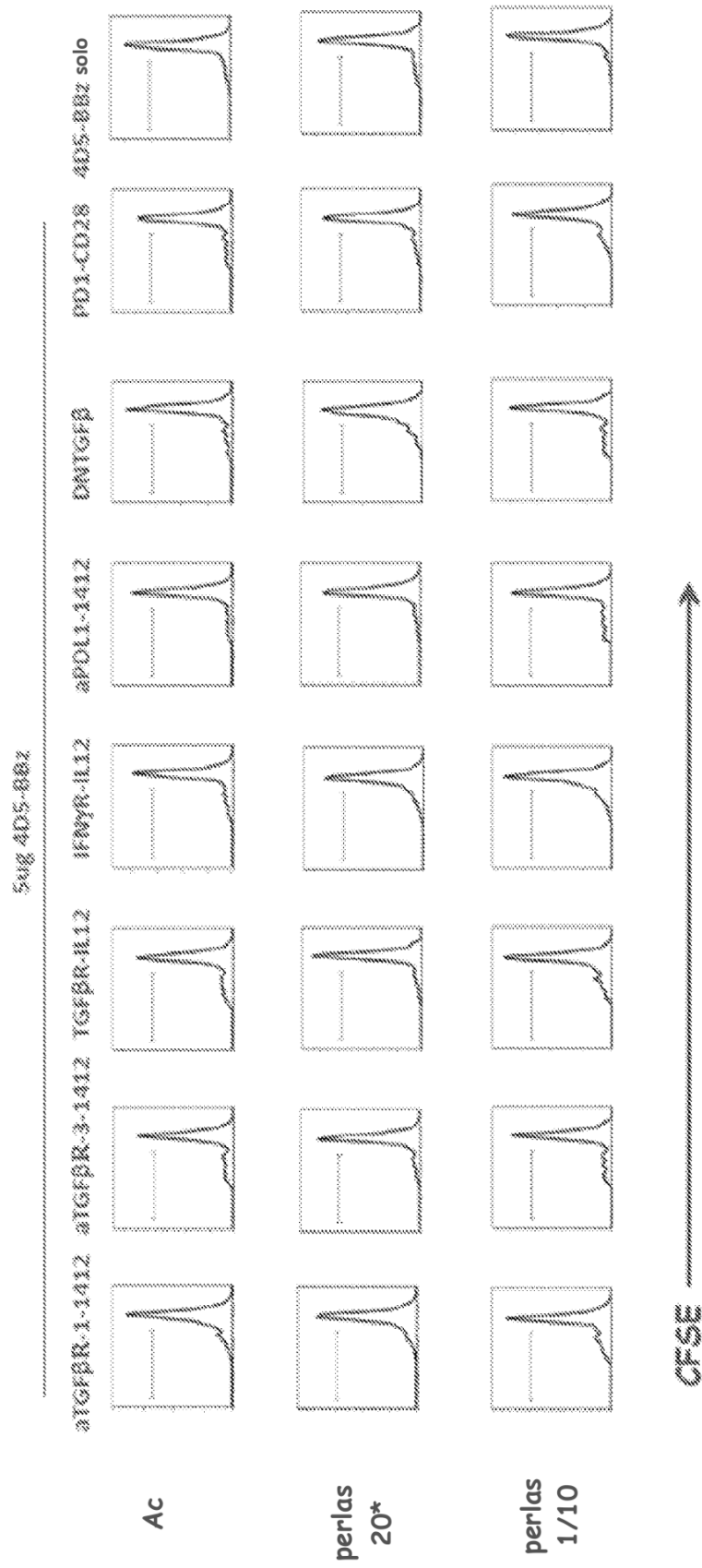


Figura 15

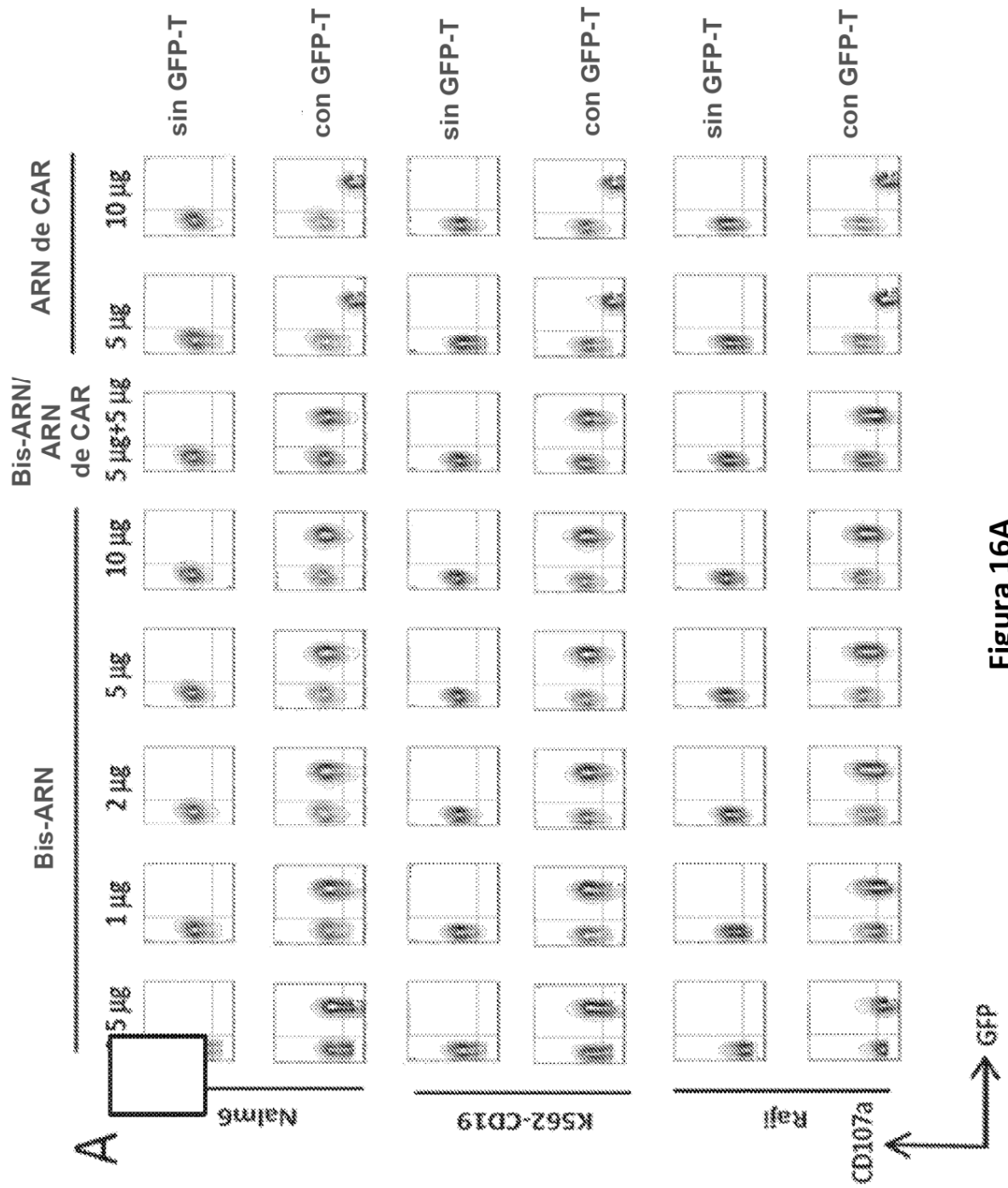


Figura 16A

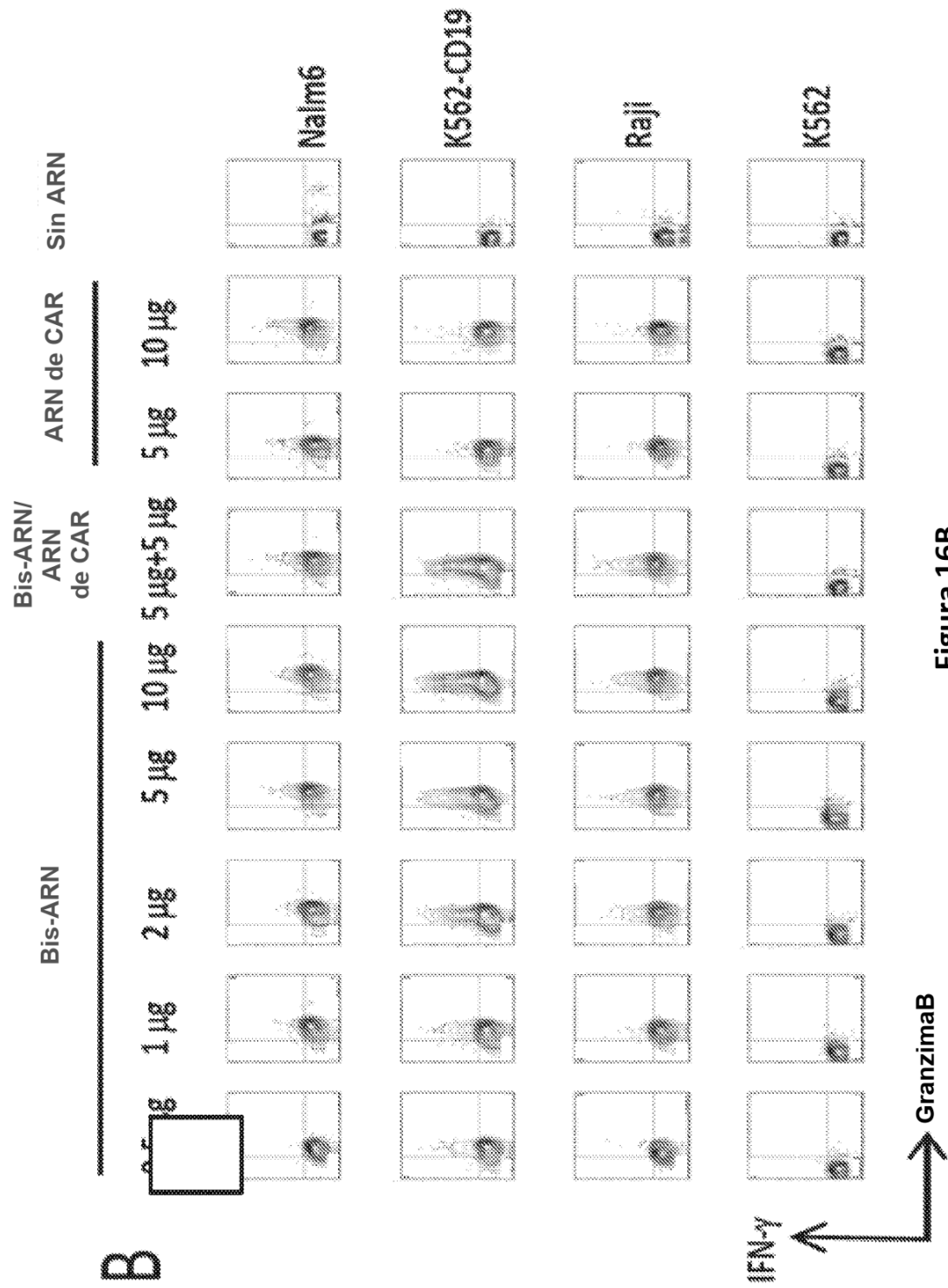


Figura 16B

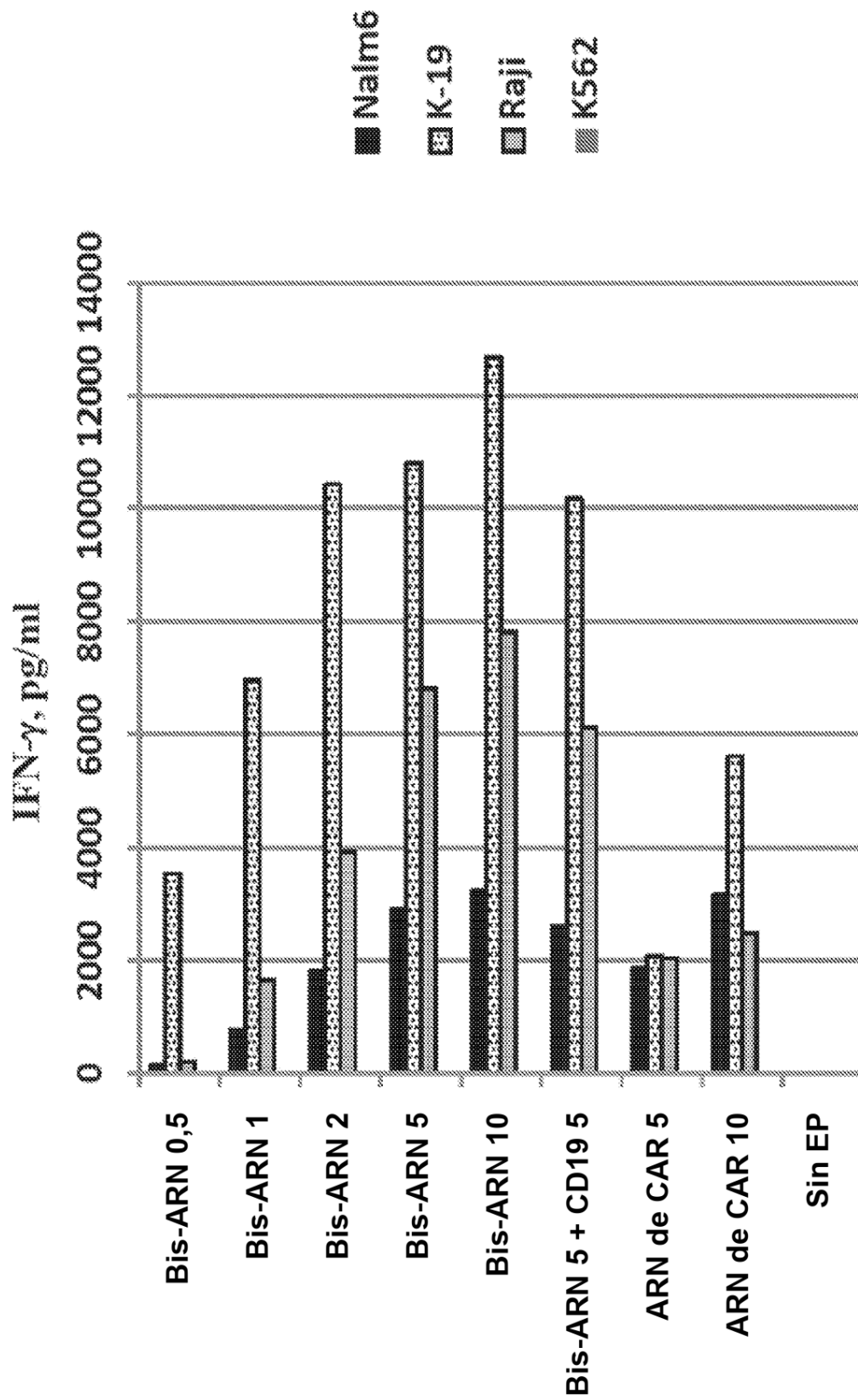


Figura 16C

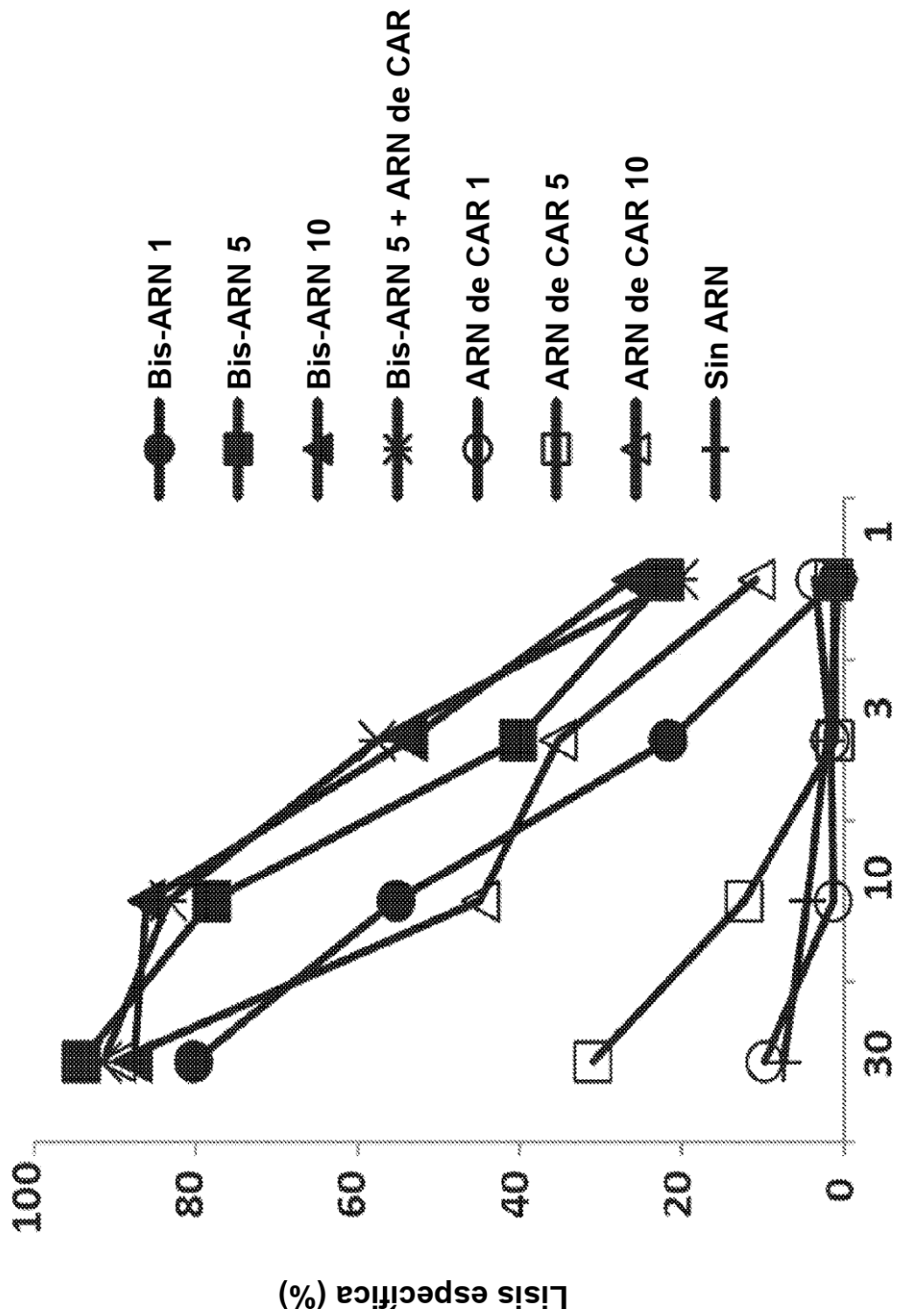


Figura 16D

ARN de prueba mediante coelectroporación			
N.º	ARN	CD19z	EP
1	10ug PD-1		
2	10ug PD-1-CD28		
3	10ug 10A5-1412		
4	10ug 13G4-1412		
5	10ug 1B12-1412		
6	10ug PD1-CD80		
7	10ug PD1-CD86		
8	10ug CD80-PD1		
9	10ug CD86-PD1	2ug	Sí
10	10ug PDL1-CD80		
11	10ug PDL1-CD86		
12	10ug PDL2-CD80		
13	10ug PDL2-CD86		
14	10ug CD80-PDL1		
15	10ug CD80-PDL2		
16	10ug CD86-PDL1		
17	Ninguno		
18	Ninguno	Ninguno	No

Figura 17

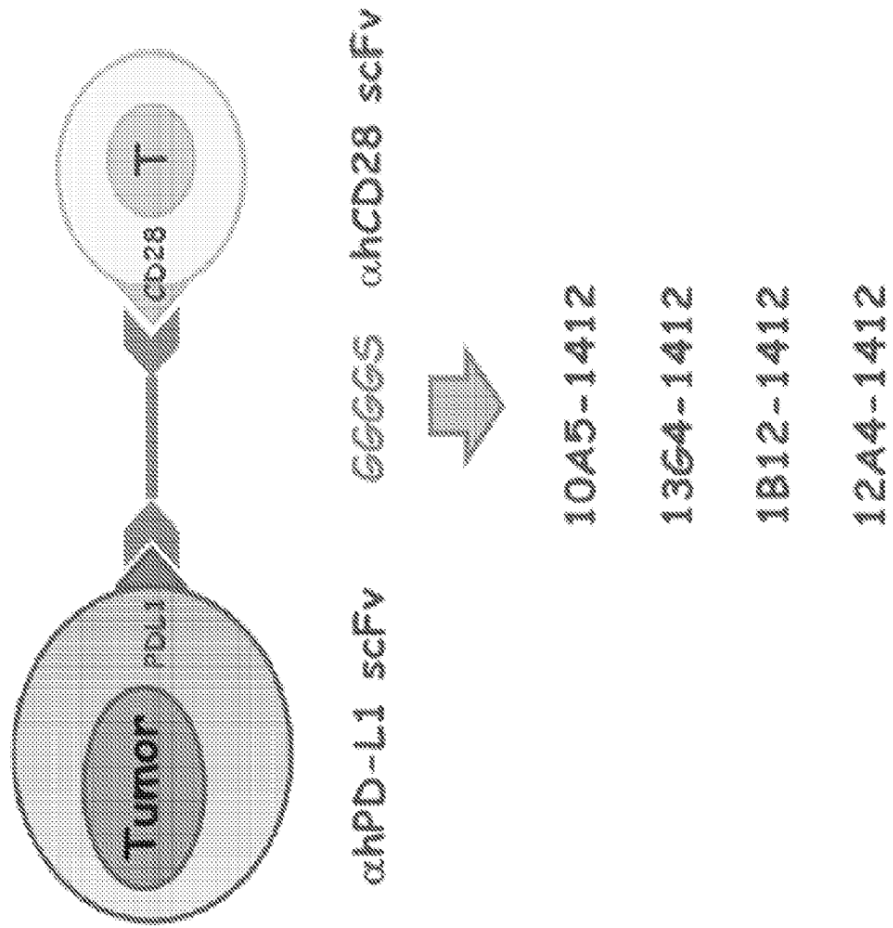


Figure 18

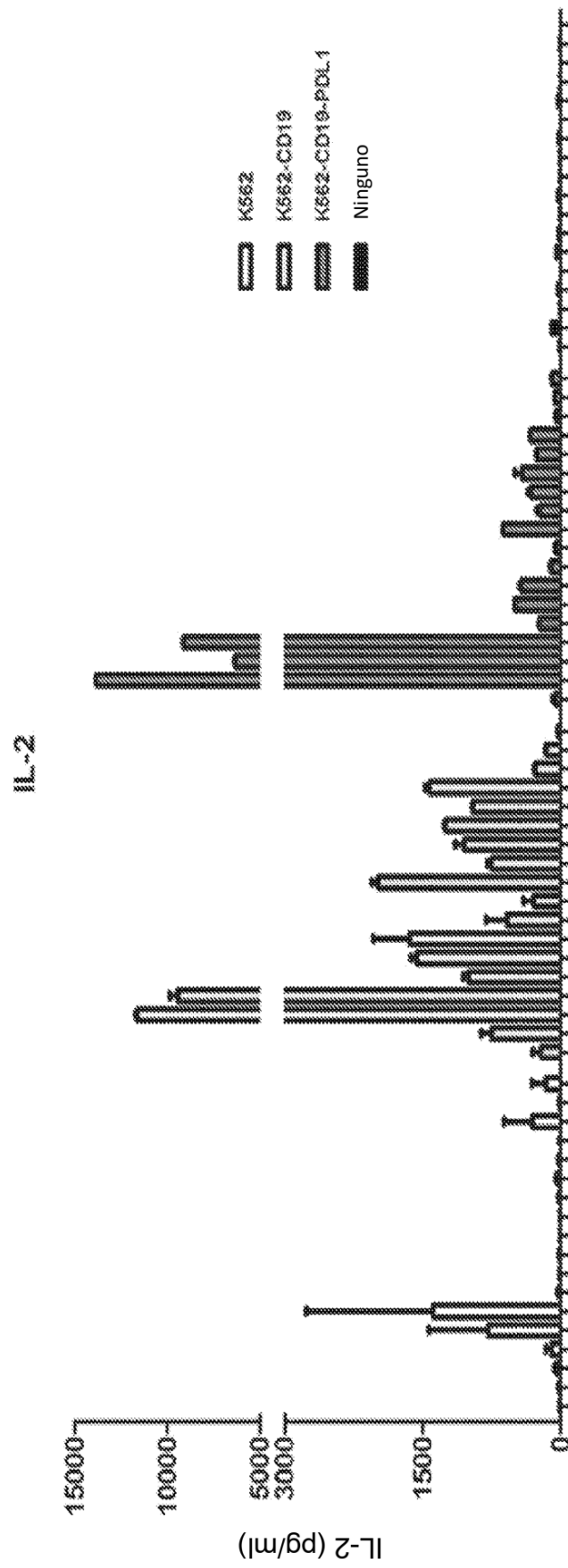


Figura 19A

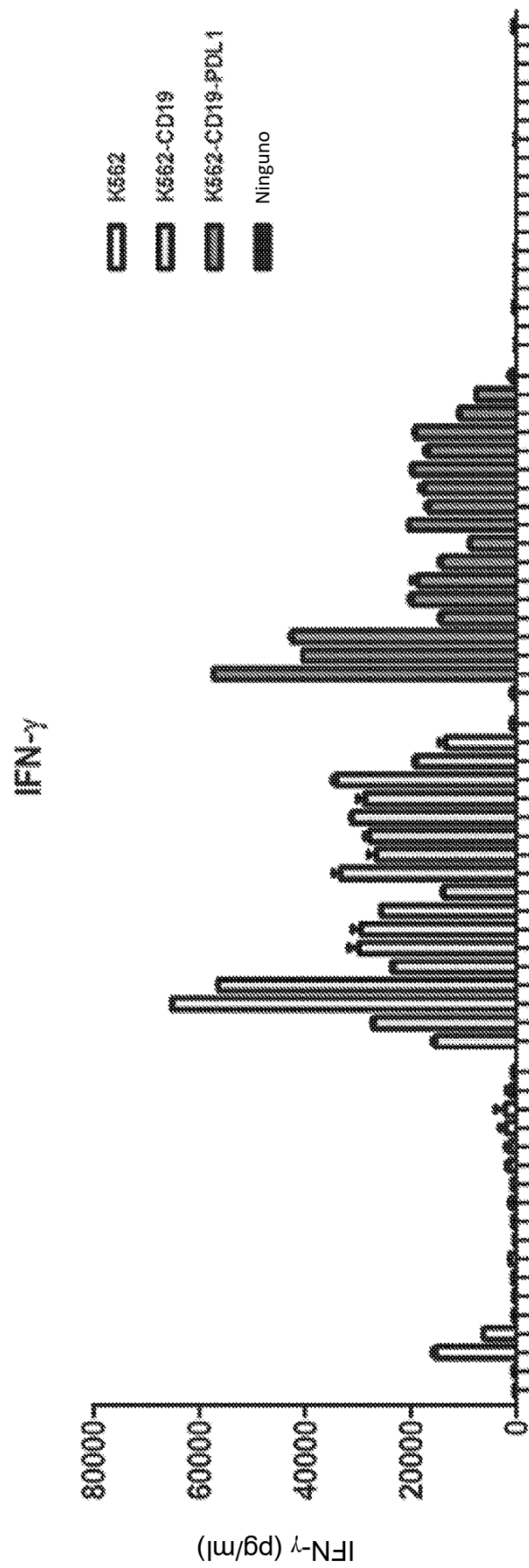


Figura 19B

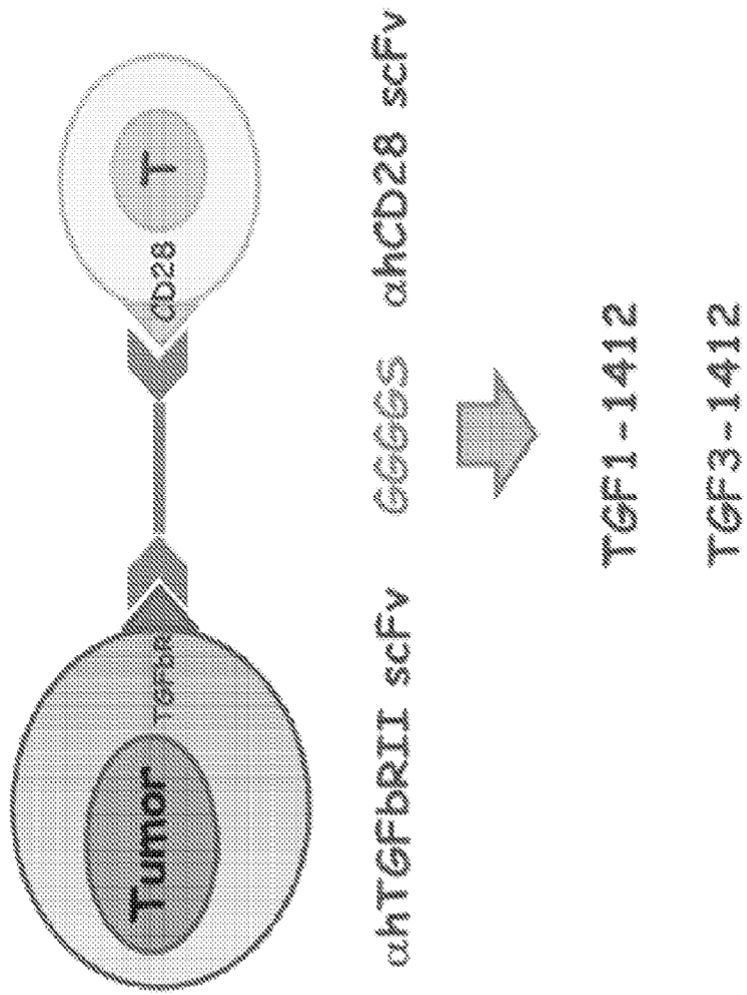


Figura 20