



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 875 959**

⑮ Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2017 PCT/US2017/055628**

⑯ Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18067993**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2017 E 17797464 (9)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020 EP 3445787**

⑮ Título: **Composiciones y métodos para reprogramación de receptores de linfocitos T mediante el uso de proteínas de fusión**

⑯ Prioridad:

**07.10.2016 US 201662405551 P
23.05.2017 US 201762510108 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2021

⑯ Titular/es:

**TCR2 THERAPEUTICS INC. (100.0%)
100 Binney Street, 7th Floor
Cambridge, Massachusetts 02142, US**

⑯ Inventor/es:

**BAEUPERLE, PATRICK;
SIECZKIEWICZ, GREGORY y
HOFMEISTER, ROBERT**

⑯ Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 875 959 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 reprogramación de receptores de linfocitos T mediante el uso de proteínas de fusión

5 **Referencia cruzada**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/405.551, presentada el 7 de octubre de 2016 y la solicitud provisional estadounidense n.º 62/510.108, presentada el 23 de mayo de 2017.

10 **Antecedentes**

La mayoría de los pacientes con tumores sólidos de fase avanzada son incurables con terapias estándar. Además, las opciones de tratamiento tradicionales frecuentemente tienen efectos secundarios graves. Se han realizado numerosos intentos para hacer que el sistema inmunitario de un paciente rechace las células cancerosas, enfoque al que se hace referencia de forma conjunta como inmunoterapia contra el cáncer. Sin embargo, existen diversos obstáculos que dificultan que se logre la eficacia clínica. Si bien se han identificado cientos de los denominados antígenos tumorales, estos a menudo derivan del mismo organismo y, por lo tanto, pueden dirigir la inmunoterapia contra el cáncer hacia tejido sano o son escasamente inmunogénicos. Además, las células cancerosas usan múltiples mecanismos para hacerse invisibles u hostiles al inicio y la propagación de un ataque al sistema inmunitario por parte de las inmunoterapias contra el cáncer.

25 Recientes avances que usan una terapia de linfocitos T autólogos modificados por un receptor de antígeno químérico (CAR, por sus siglas en inglés), que se basa en la redirección de linfocitos T modificados genéticamente a una molécula de superficie celular adecuada en las células cancerosas, muestran resultados prometedores en el aprovechamiento de la potencia del sistema inmunitario para tratar neoplasias de linfocitos B (véase, por ejemplo, Sadelain *et al.*, *Cancer Discovery* 3:388-398 (2013)). Los resultados clínicos con linfocitos T CAR específicos para CD-19 (denominados CTL019) han demostrado remisión total en pacientes que padecen leucemia linfocítica crónica (LLC) así como leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA) (véase, por ejemplo, Kalos *et al.*, *Sci Transl Med* 3:95ra73 (2011), Porter *et al.*, *NEJM* 365:725-733 (2011), Grupp *et al.*, *NEJM* 368:1509-1518 (2013)). Se describen CAR 30 dirigidos contra mesotelina en el documento WO2013063419. Un enfoque alternativo es el uso de las cadenas alfa y beta del receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) seleccionadas para un antígeno de péptido asociado a un tumor para modificar genéticamente los linfocitos T autólogos. Véase, por ejemplo, el documento EP2258719. Estas cadenas de TCR formarán complejos TCR completos y proporcionarán los linfocitos T con un TCR para una 35 segunda especificidad definida. Se obtuvieron resultados alentadores con linfocitos T autólogos modificados que expresan las cadenas alfa y beta de TCR específico para NY-ESO-1 en pacientes con carcinoma sinovial.

40 Además de la capacidad de los linfocitos T modificados genéticamente que expresan un CAR o un segundo TCR de reconocer y destruir las respectivas células objetivo *in vitro/ex vivo*, la terapia exitosa en pacientes con linfocitos T modificados requiere que los linfocitos T sean capaces de una potente activación, expansión, continuidad en el tiempo y, en caso de una enfermedad recidivante, que permitan una respuesta "de memoria". La eficacia clínica elevada y 45 manejable de linfocitos T CAR se encuentra limitada actualmente a pacientes con neoplasias de linfocitos B positivos a CD-19 y BCMA y con sarcoma sinovial con expresión del péptido NY-ESO-1 que expresen HLA-A2. Existe una necesidad clara de mejorar los linfocitos T modificados genéticamente para que actúen de forma más amplia contra diversas neoplasias humanas. En la presente se describen proteínas de fusión novedosas de subunidades de TCR, 50 inclusive CD3 épsilon, CD3 gamma y CD3 delta, y de las cadenas TCR alfa y TCR beta con dominios de unión específicos para los antígenos de superficie celular que tienen el potencial de vencer las limitaciones de los enfoques existentes. En la presente se describen proteínas de fusión novedosas que eliminan de forma más eficiente las células objetivo que CAR, pero liberan niveles comparables o menores de citocinas proinflamatorias. Estas proteínas de fusión y métodos para su uso representan una ventaja para las proteínas de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR) respecto a CAR ya que los niveles elevados de estas citocinas se han asociado con toxicidades que limitan la dosis para las terapias con CAR-T adoptivas.

Compendio de la invención

55 La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR) que comprende:

(a) una subunidad de TCR que comprende

60 (i) al menos una parte de un dominio extracelular de TCR de una subunidad de TCR CD3 épsilon,

(ii) un dominio transmembrana de una subunidad de TCR CD3 épsilon y

(iii) un dominio intracelular de una subunidad de TCR CD3 épsilon que incluye su dominio de señalización; y

(b) un scFv o sdAb humano o humanizado que comprende un dominio de unión antimesotelina;

65 en donde la subunidad de TCR y el dominio de unión antimesotelina están unidos operativamente y en donde la molécula de TFP es capaz de interactuar funcionalmente con un complejo de TCR endógeno y/o al menos un

polipéptido de TCR endógeno, en donde el dominio de unión antimesotelina codificado está conectado al dominio extracelular de TCR codificado por una secuencia conectora codificada.

5 En la presente se proporcionan las correspondientes proteínas de fusión del receptor de linfocitos T (TCR) (TFP, por sus siglas en inglés), linfocitos T modificados para expresar una o más TFP y métodos para usar estos para el tratamiento de enfermedades. La invención se expone en las reivindicaciones.

10 La divulgación técnica detallada expuesta a continuación, así como el sumario de sus enseñanzas más destacadas que aparece a continuación, puede, en algunos aspectos, sobrepassar la propia divulgación de la invención y puede proporcionar también antecedentes técnicos para avances técnicos relacionados. Se apreciará que no se pretende que los antecedentes técnicos adicionales proporcionados definan la invención como tal (que está definida exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas), sino más bien que la sitúen en un contexto técnico más amplio. En consecuencia, se apreciará que las expresiones "modalidades", "aspectos", "materia en cuestión" reflejan detalles específicos de la divulgación pero, en la medida en que se refieren a una parte de los antecedentes técnicos adicionales, no se pretende que definan parte de la materia en cuestión de la invención que no quede dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de enseñanzas técnicas

20 Se describe en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR) que comprende una subunidad de TCR y un dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina.

25 Se describe en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR), que comprende una subunidad de TCR que comprende al menos una parte de un dominio extracelular de TCR y un dominio intracelular de TCR que comprende un dominio estimulador de un dominio de señalización intracelular de CD3 épsilon; y un dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno donde la subunidad de TCR y el dominio de anticuerpo se enlazan de forma operativa, y donde la TFP se incorpora a un TCR cuando se expresa en un linfocito T.

30 Se describe en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR), que comprende una subunidad de TCR que comprende al menos una parte de un dominio extracelular de TCR y un dominio intracelular de TCR que comprende un dominio estimulador de un dominio de señalización intracelular de CD3 gamma; y un dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno donde la subunidad de TCR y el dominio de anticuerpo se enlazan de forma operativa, y donde la TFP se incorpora a un TCR cuando se expresa en un linfocito T.

35 Se describe en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR), que comprende una subunidad de TCR que comprende al menos una parte de un dominio extracelular de TCR y un dominio intracelular de TCR que comprende un dominio estimulador de un dominio de señalización intracelular de CD3 delta; y un dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno donde la subunidad de TCR y el dominio de anticuerpo se enlazan de forma operativa, y donde la TFP se incorpora a un TCR cuando se expresa en un linfocito T.

40 Se describe en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR), que comprende una subunidad de TCR que comprende al menos una parte de un dominio extracelular de TCR y un dominio intracelular de TCR que comprende un dominio estimulador de un dominio de señalización intracelular de CD3 alfa; y un dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno donde la subunidad de TCR y el dominio de anticuerpo se enlazan de forma operativa, y donde la TFP se incorpora a un TCR cuando se expresa en un linfocito T.

45 Se describe en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR), que comprende una subunidad de TCR que comprende al menos una parte de un dominio extracelular de TCR y un dominio intracelular de TCR que comprende un dominio estimulador de un dominio de señalización intracelular de TCR beta; y un dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno donde la subunidad de TCR y el dominio de anticuerpo se enlazan de forma operativa, y donde la TFP se incorpora a un TCR cuando se expresa en un linfocito T.

50 Se describe en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR) que comprende una subunidad de TCR y un dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno que es un dominio de unión a anti-mesotelina.

55 La subunidad de TCR y el dominio del anticuerpo se encuentran unidos de forma operativa. En algunos casos, la TFP se incorpora en un TCR cuando se expresa en un linfocito T. El dominio de unión al antígeno codificado se conecta al dominio extracelular del TCR mediante una secuencia enlazadora. En algunos casos, la secuencia enlazadora codificada comprende (G_nS)_n, donde n=1 a 4. La subunidad de TCR comprende (i) un dominio extracelular de TCR,

(ii) un dominio transmembrana de TCR y (iii) un dominio intracelular de TCR, donde (i), (ii) y (iii) son de la misma subunidad de TCR. La subunidad de TCR comprende un dominio intracelular de TCR que comprende un dominio estimulador CD3 épsilon de un dominio de señalización intracelular de CD3 épsilon o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones en esta. Como se desvela en algunos casos, la subunidad de TCR comprende un dominio intracelular que comprende un dominio estimulador que se selecciona de un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una modificación en esta. El dominio de anticuerpo humano o humanizado comprende un scFv o un dominio V_H. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico aislado codifica (i) una CDR1 de cadena ligera (LC), CDR2 LC y CDR3 LC de un secuencia de aminoácidos de dominio de unión de cadena ligera con 70-100 % de identidad de secuencia con respecto a una CDR1 de cadena ligera (LC), CDR2 LC y CDR3 LC de un dominio de unión de cadena ligera anti-mesotelina que se proporciona en la presente, respectivamente; y/o (ii) una CDR1 de cadena pesada (HC), CDR2 HC y CDR3 HC de un secuencia de aminoácidos de dominio de unión de cadena pesada con 70-100 % de identidad de secuencia con respecto a una CDR1 de cadena pesada (HC), CDR2 HC y CDR3 HC de un dominio de unión de cadena pesada anti-mesotelina que se proporciona en la presente, respectivamente. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, pero no más de 30, modificaciones de una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de una región variable de cadena ligera proporcionada en la presente, o una secuencia con 95-99 % de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de una región variable de cadena ligera proporcionada en la presente. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico aislado codifica una región variable de cadena pesada, donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, pero no más de 30, modificaciones de una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de una región variable de cadena pesada proporcionada en la presente, o una secuencia con 95-99 % de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de una región variable de cadena pesada proporcionada en la presente. La TFP incluye un dominio extracelular de una subunidad de TCR que comprende un dominio extracelular, o una parte de este, de una proteína de una subunidad de TCR CD3 épsilon, fragmentos funcionales de esta y secuencias de aminoácidos de estas que tienen al menos una pero no más de 20 modificaciones. La TFP codificada incluye un dominio de transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína de una subunidad de TCR CD3 épsilon, fragmentos funcionales de esta y secuencias de aminoácidos de estas que tienen al menos una pero no más de 20 modificaciones. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico aislado comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En algunos casos, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional obtenido de una proteína que se selecciona del grupo que consiste en DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137), y las secuencias de aminoácidos de estos que tienen al menos una pero no más de 20 modificaciones en estas. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico aislado comprende además una secuencia líder. En algunos casos, la molécula de ácido nucleico aislado es ARNm.

En algunos casos, la TFP incluye un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés) de una subunidad de TCR que comprende un ITAM, o una parte de este, de una proteína que se selecciona del grupo que consiste en una subunidad de TCR CD3 zeta, una subunidad de TCR CD3 épsilon, una subunidad de TCR CD3 gamma, una subunidad de TCR CD3 delta, una cadena zeta de TCR, una cadena del receptor Fc épsilon 1, una cadena del receptor Fc épsilon 2, una cadena del receptor Fc gamma 1, una cadena del receptor Fc gamma 2a, una cadena del receptor Fc gamma 2b1, una cadena del receptor Fc gamma 2b2, una cadena del receptor Fc gamma 3a, una cadena del receptor Fc gamma 3b, una cadena del receptor Fc beta 1, TYROBP (DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionales de estos, y secuencias de aminoácidos de estos que tienen al menos una pero no más de 20 modificaciones a estas. En algunos casos, el ITAM remplaza un ITAM de CD3 gamma, CD3 delta o CD3 épsilon. En algunos casos, el ITAM se selecciona del grupo que consiste en una subunidad de TCR CD3 zeta, una subunidad de TCR CD3 épsilon, una subunidad de TCR CD3 gamma y una subunidad de TCR CD3 delta y remplaza un ITAM diferente que se selecciona del grupo que consiste en una subunidad de TCR CD3 zeta, una subunidad de TCR CD3 épsilon, una subunidad de TCR CD3 gamma y una subunidad de TCR CD3 delta.

En algunos casos, el ácido nucleico comprende un análogo de nucleótido. En algunos casos, el análogo de nucleótido se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), T-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA) modificado, un ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), un ácido nucleico de etileno (ENA, por sus siglas en inglés), un ácido nucleico de péptido (PNA, por sus siglas en inglés), un ácido nucleico de 1',5'- anhidrohexitol (HNA, por sus siglas en inglés), un morfolino, un nucleótido metilfosfonato, un nucleótido tiolfosfonato y una 2'-fluoro N3-P5'-fosforamidita.

En un aspecto, se proporciona en la presente una molécula de polipéptido aislada codificada por una molécula de ácido nucleico que se proporciona en la presente.

En un aspecto, se proporciona en la presente una molécula de TFP aislada que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio

intracelular como se expone en las reivindicaciones.

En un aspecto, se proporciona en la presente una molécula de TFP aislada que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde la molécula de TFP es capaz de interactuar de forma funcional con un complejo endógeno de TCR y/o al menos un polipéptido endógeno de TCR y como se expone en las reivindicaciones.

En algunas modalidades, el dominio de anticuerpo humano o humanizado comprende un dominio de unión al antígeno que es un dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico o un anticuerpo que comprende el dominio de unión a anti-mesotelina, o una célula que expresa el dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico que tiene un valor de afinidad de como máximo alrededor de 200 nM, 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM; y/o por lo menos alrededor de 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM; y/o alrededor de 200 nM, 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM.

En un aspecto, se proporciona en la presente una molécula de TFP aislada que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde la molécula de TFP es capaz de integrarse de forma funcional al complejo endógeno de TCR y como se expone en las reivindicaciones.

La molécula de TFP aislada, como se expone en las reivindicaciones, comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, donde el dominio de unión a anti-mesotelina es un scFv o un SdAb, tal como un dominio V_H o un dominio V_{HH} camélido. En algunos casos, el dominio de unión a anti-mesotelina comprende una cadena pesada con 95-100 % de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada proporcionada en la presente, un fragmento funcional de esta o una secuencia de aminoácidos de esta que tiene al menos una, pero no más de 30 modificaciones. En algunos casos, el dominio de unión a anti-mesotelina comprende una cadena ligera con 95-100 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera proporcionada en la presente, un fragmento funcional de esta o una secuencia de aminoácidos de esta que tenga al menos una pero no más de 30 modificaciones. El dominio de unión a anti-mesotelina se conecta con el dominio extracelular de TCR mediante una secuencia enlazadora. En algunos casos, la región enlazadora comprende $(G_4S)_n$, donde $n=1$ a 4.

En algunos casos, la molécula de TFP aislada comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. La molécula de TFP aislada comprende una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, la molécula de TFP aislada comprende además una secuencia líder.

En un aspecto, se proporciona en la presente un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una TFP que se proporciona en la presente. En algunos casos, el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, un vector adenoviral, un vector del virus de sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés) o un vector de retrovirus. En algunos casos, el vector comprende además un promotor. En algunos casos, el vector es un vector transrito *in vitro*. En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una cola de polí(A). En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una UTR 3'.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un vector que se proporciona en la presente. En algunos casos, la célula es un linfocito T humano. En algunos casos, el linfocito T es un linfocito T CD8+ o CD4+. En algunos casos, el linfocito T es un linfocito T gamma delta. En algunos casos, el linfocito T es un linfocito T NK. En algunos casos, la célula comprende además un ácido nucleico que codifica una molécula inhibidora que comprende un primer polipéptido que comprende al menos una parte de una molécula inhibidora, que se asocia con un segundo polipéptido que comprende una señal positiva de un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, la molécula inhibidora comprende un primer polipéptido que comprende al menos una parte de PD1 y un segundo polipéptido que comprende un dominio coestimulador y un dominio de señalización primario.

En un aspecto, se proporciona en la presente un linfocito T CD8+ o CD4+ humano que comprende al menos dos moléculas de TFP, donde las moléculas de TFP comprenden un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, donde la molécula de TFP es capaz de interactuar de forma funcional con un complejo endógeno de TCR y/o al menos un polipéptido endógeno de TCR dentro, en y/o sobre la superficie del linfocito T CD8+ o CD4+ humano.

Se describe en la presente un complejo de proteína que comprende: una molécula de TFP que comprende un dominio

de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular; y al menos un complejo endógeno de TCR.

5 Se describe en la presente un linfocito T CD8+ o CD4+ humano que comprende al menos dos proteínas TFP diferentes por complejo de proteína que se proporciona en la presente.

Se describe en la presente un método para crear una célula que comprende la transducción de un linfocito T con un vector que se proporciona en la presente.

10 Se describe en la presente un método para generar una población de células con modificación de ARN que comprende la introducción de un ARN transcrit *in vitro* o ARN sintético en una célula, donde el ARN comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de TFP que se proporciona en la presente.

15 Se describe en la presente un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una célula que exprese una molécula de TFP que se proporciona en la presente, o que exprese una molécula de polipéptido que se proporciona en la presente.

20 En algunos casos, la célula es un linfocito T autólogo. En algunos casos, la célula es un linfocito T alogénico. En algunos casos, el mamífero es un ser humano.

20 En un aspecto, se proporciona en la presente el uso de la invención reivindicada para el tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina, que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una molécula de TFP que se proporciona en la presente, una célula que se proporciona en la presente o una molécula de polipéptido que se proporciona en la presente. En algunos casos, la enfermedad asociada con la expresión de mesotelina se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, un cáncer, una neoplasia maligna y una indicación no relacionada con cáncer asociada con la expresión de mesotelina. En algunos casos, la enfermedad es un cáncer que se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, carcinoma de células renales, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer cerebral, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, cáncer de uréter, cáncer de riñón, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de timo, colangiocarcinoma y cáncer de estómago.

35 En algunos casos, la enfermedad es cáncer. En algunos casos, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, carcinoma de ovario seroso papilar, carcinoma de ovario de células claras, carcinoma de ovario mülleriano mixto, carcinoma de ovario mucinoso endometriode, enfermedad pleural maligna, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de páncreas ductal, carcinoma seroso uterino, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma del conducto biliar extrahepático, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de esófago, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma de mama, una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina, una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina, carcinoma de ovario no mucinoso, adenocarcinoma ductal invasivo, adenocarcinoma pulmonar, adenocarcinoma gástrico/de esófago, adenocarcinoma colorrectal, leucemia, leucemia mieloide aguda pediátrica, neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN, por sus siglas en inglés), adenocarcinoma de endometrio, adenocarcinoma de estómago/esófago, adenocarcinoma pulmonar, adenocarcinoma de mama y combinaciones de estos.

45 En algunos casos, las células que expresan una molécula de TFP se administran combinadas con un agente que aumenta la eficacia de una célula que exprese una molécula de TFP. En algunos casos, se liberan menos citocinas en el mamífero en comparación con un mamífero al que se administra una cantidad eficaz de un linfocito T que exprese un receptor de antígeno químérico (CAR) anti-mesotelina. En algunos casos, las células que expresan una molécula de TFP se administran combinadas con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de TFP. En algunos casos, las células que expresan una molécula de TFP se administran combinadas con un agente que trata la enfermedad asociada con mesotelina.

55 En un aspecto, una molécula de ácido nucleico aislado que se proporciona en la presente, una molécula de polipéptido aislada que se proporciona en la presente, una TFP aislada que se proporciona en la presente, un complejo que se proporciona en la presente, un vector que se proporciona en la presente o una célula que se proporciona en la presente son para su uso como un medicamento.

60 En un aspecto, se proporciona en la presente la invención como se reivindica para su uso en el tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina, que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una molécula de TFP que se proporciona en la presente, una célula que se proporciona en la presente o una molécula de polipéptido que se proporciona en la presente, donde se liberan menos citocinas en el mamífero en comparación con un mamífero al que se administra una cantidad eficaz de un linfocito T que exprese un receptor de antígeno químérico (CAR) anti-mesotelina.

Breve descripción de las figuras

En las reivindicaciones adjuntas se establecen de forma particular las características novedosas de la invención. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se pueden obtener con referencia a la siguiente descripción detallada que establece modalidades ilustrativas, en las que se usan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos en los cuales:

- 5 La **FIG. 1** es una ilustración esquemática que demuestra el uso de los polipéptidos de fusión del receptor de linfocitos T (TFP) de la invención. Un ejemplo de TFP contiene un scFv anti-mesotelina y un polipéptido CD3 épsilon de longitud completa fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃. Cuando se produce o se introduce en un linfocito T, la TFP se asocia con otros polipéptidos del receptor de linfocitos T endógeno (TCR) (que se muestra que incluye dos polipéptidos CD3 épsilon, un polipéptido CD3 gamma, un polipéptido CD3 delta, dos polipéptidos CD3 zeta, una subunidad TCR alfa y una subunidad TCR beta, donde el segmento gris horizontal representa la membrana plasmática) para formar un TCR reprogramado en el cual uno o ambos polipéptidos endógenos CD3 épsilon se sustituyen por TFP.
- 10 La **FIG. 2** representa ilustraciones esquemáticas que demuestran ejemplos de variaciones de polipéptidos de fusión del receptor de linfocitos T reprogramados (TFP) de la invención. La ilustración denominada scFv:TCR-V α ilustra un ejemplo de TCR reprogramado que contiene una TFP que contiene un scFv anti-mesotelina y un polipéptido V α de TCR de longitud completa fusionado mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃. La ilustración denominada scFv:TCR-V α :TCR-V β ilustra un TCR reprogramado ilustrativo que contienen múltiples TFP, inclusive i) un scFv anti-mesotelina y un polipéptido V α de TCR de longitud completa fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃ y ii) un scFv anti-mesotelina y un polipéptido V β de TCR de longitud completa fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃. La ilustración denominada scFv: Δ TCR-V α :CD3 ϵ ilustra un TCR reprogramado ilustrativo que contienen múltiples TFP, inclusive i) un scFv anti-mesotelina y un polipéptido TCR (Δ) truncado fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃ y ii) un scFv anti-mesotelina y un polipéptido CD3 épsilon de longitud completa fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃. El polipéptido del TCR truncado (Δ) se trunca mediante la eliminación de V α . La ilustración denominada scFv: Δ TCR-V α : Δ TCR-V β ilustra un TCR reprogramado ilustrativo que contienen múltiples TFP, inclusive i) un scFv anti-mesotelina y un polipéptido V α de TCR (Δ) truncado fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃ y ii) un scFv anti-mesotelina y un polipéptido V β de TCR (Δ) truncado fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃. El polipéptido del TCR truncado (Δ) se encuentra truncado por la eliminación de V β .
- 15 La **FIG. 3** es una ilustración esquemática que demuestra el uso de los polipéptidos de fusión del receptor de linfocitos T (TFP) de la invención. Un ejemplo de TFP contiene un dominio V_H anti-mesotelina y un polipéptido CD3 épsilon de longitud completa fusionados mediante una secuencia enlazadora (G₄S)₃. Cuando se produce mediante un linfocito T o se introduce en un linfocito T, la TFP se asocia con otros polipéptidos del receptor de linfocitos T endógeno (TCR) (que se muestra que incluye dos polipéptidos CD3 épsilon, un polipéptido CD3 gamma, un polipéptido CD3 delta, dos polipéptidos CD3 zeta, una subunidad TCR alfa y una subunidad TCR beta, donde el segmento gris horizontal representa la membrana plasmática) para formar un TCR reprogramado en el cual uno o ambos polipéptidos endógenos CD3 épsilon se sustituyen por TFP.
- 20 La **FIG. 4** es una serie de ilustraciones esquemáticas que demuestran construcciones de ADN que codifican diversas TFP.
- 25 La **FIG. 5A** muestra un análisis de expresión en superficie ilustrativo de TFP sobre células PBMC activadas y muestra células CD3 $^+$ (APC anti-CD3, compuerta) activadas con TFP de MSLN y teñidas para CD8 (APCCy7 anti-CD8, ejes y) y mesotelina ("MSLN") (Zenon® IgG hMSLN marcada con R-Ficoeritrina, ejes x). De izquierda a derecha se muestran células que estaban ya sea no transducidas o transducidas con construcciones de TFP anti-MSLN-CD3 ϵ , CAR anti-MSLN-CD28 ζ y CAR anti-MSLN-41BB ζ .
- 30 La **FIG. 5B** representa análisis de expresión en superficie ilustrativo de TFP sobre células PBMC activadas y muestra las células activadas con TFP de dominio individual interno y teñidas con Fc de MSLN y analizadas para detectar GFP. La fila superior muestra (de izquierda a derecha) células no transducidas y células transducidas con un control de TFP anti-MSLN-CD3 ϵ ("SS1"). Las filas 2-4 muestran los aglutinantes anti-MSLN SD1, SD4 y SD6, respectivamente, en células transducidas con construcciones marcadas con GFP (de izquierda a derecha) de CD3 ϵ TFP, CD3yTFP, TCR β TFP y CD28 ζ CAR.
- 35 La **FIG. 6A** es una gráfica ilustrativa que representa la muerte de células objetivo HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino, ATCC® CCL-2™) positivas a mesotelina (MSLN) mediante construcciones anti-MSLN-TFP con el tiempo. Las PBMC activadas estaban sin tratar (traza n.º 1), no transducidas (traza n.º 2) o transducidas con vector vacío (traza n.º 3), TFP anti-MSLN-CD3 ϵ (traza n.º 4), CAR anti-MSLN-CD28 ζ o CAR anti-MSLN-41BB ζ y se expandieron durante 8 días antes de la incubación con 1x10⁴ células objetivo HeLa positivas a MSLN.
- 40 La **FIG. 6B** es una gráfica ilustrativa que representa la muerte de células objetivo HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino, ATCC® CCL-2™) negativas para MSLN mediante construcciones anti-MSLN-TFP con el tiempo. Las PBMC activadas estaban sin tratar (traza n.º 1), no transducidas (traza n.º 2) o transducidas con vector vacío (traza n.º 3), TFP anti-MSLN-CD3 ϵ (traza n.º 4), CAR anti-MSLN-CD28 ζ o CAR anti-MSLN-41BB ζ y se expandieron durante 8 días antes de la incubación con 1x10⁴ células objetivo HeLa positivas a MSLN.
- 45 La **FIG. 6C** muestra la destrucción de células positivas a MSLN en una línea celular con alta expresión de MSLN (células HeLa) mediante el uso de linfocitos T a partir de dos donantes humanos diferentes (superior e inferior). Se muestran trazas de destrucción celular para linfocitos T de TFP con los aglutinantes anti-MSLN internos SD1 (FIG. 7A), SD4 (centro) y SD6 (derecha). Las PBMC activadas eran no transducidas (traza n.º 1) o transducidas con CD3 ϵ TFP (traza n.º 2), CD3y TFP (traza n.º 3), TCR β TFP (traza n.º 4) o CD28 ζ CAR. Se determinó el índice celular normalizado, que indica la citotoxicidad, en un ensayo de analizador celular en tiempo real (RTCA, por sus

siglas en inglés).

La **FIG. 7** es una serie de gráficas que muestra la actividad de unión de linfocitos T CAR anti-MSLN y linfocitos T de TFP contra una línea celular objetivo que expresa niveles elevados de mesotelina (HeLa-Luc(^{MSLN alta})). Se muestran los % de células en muestras sin linfocitos T (“solamente objetivo”), transducidas con vector vacío (“NT”), anti-MSLN (control positivo) o linfocitos T de TFP anti-mesotelina con aglutinantes anti-mesotelina internos SD1 (**FIG. 7A**), SD4 (**FIG. 7B**) y SD6 (**FIG. 7C**), cada uno en el formato de CD3ε TFP, CD3γ TFP, TCRβ TFP y CD28ζ CAR. En cada gráfica, las barras negras representan una relación 1:1 de linfocitos T con respecto a las células objetivo y las barras grises representan una relación 1:5 de linfocitos T con respecto a las células objetivo. Se observaron resultados similares para un segundo donante de linfocitos T.

La **FIG. 8** es una serie de gráficas que muestra la actividad de linfocitos T CAR anti-MSLN y linfocitos T de TFP contra una línea celular objetivo que expresa niveles bajos de mesotelina (PC3-MSLN(^{/baja})). Se muestran los % de células en muestras sin linfocitos T (“solamente objetivo”), transducidas con vector vacío (“NT”), anti-MSLN (control positivo, “SS1”) o construcciones anti-mesotelina internas SD1, SD4 y SD6 en los formatos de TFP CD3ε (**FIG. 8A**), CD3γ (**FIG. 8B**), TCRβ (**FIG. 8C**) y CD28ζ CAR (**FIG. 8D**). En cada gráfica, las barras negras representan una relación 1:1 de linfocitos T con respecto a las células objetivo y las barras grises representan una relación 1:5 de linfocitos T con respecto a las células objetivo. Se observaron resultados similares para un segundo donante de linfocitos T.

La **FIG. 9** muestra los resultados del análisis de FACS que demuestran la activación de linfocitos T que expresan construcciones de TFP y CAR anti-MSLN cuando se cocultivan con células MSLN+. Tal como se muestra en la **FIG. 9A**, de izquierda a derecha, los linfocitos T no se transdijeron, se transdijeron con vector vacío, se transdijeron con TFP anti-MSLN-CD3ε, CAR anti-MSLN-28ζ o CAR anti-MSLN-41BBζ. Las células cocultivadas con células MSLN- se muestran en la fila superior y las cocultivadas con células objetivo MSLN+ se muestran en la fila inferior. Las células se tiñeron entonces con anticuerpos específicos para los marcadores de activación en la superficie CD69 y CD25 o el componente de gránulo citolítico granzima B (GrB). Las cantidades de células teñidas con anti-CD69 corresponde a los ejes x y las teñidas con anti-CD25 corresponde a los ejes y. Como se muestra, los linfocitos T que expresan las construcciones de CAR y TFP anti-mesotelina se activaron mediante el cultivo con células MSLN+, según lo demuestran los niveles elevados de expresión de CD69 y CD25, en relación con el cocultivo con células MSLN- (**FIG. 9B**). Se muestra el porcentaje de células CD25+ para cada construcción en MSLN- (barras blancas) y MSLN+ (barras negras). Un experimento similar se realizó mediante el uso de células K562 MSLN- (círculos) y células K562-MSLN+ (cuadrados) ya sea en linfocitos T no transducidos o linfocitos T transducidos con aglutinantes de control positivos anti-MSLN (“510-SS1-CD3ε”) (**FIG. 9C**). Los datos representan la suma de células CD25+, CD69+ y CD25+/CD69+. En la **FIG. 9D**, se muestran datos para los aglutinantes anti-MSLN internos SD1 (cuadrados), SD4 (círculos) y SD6 (triángulos) en células objetivo K562 MSLN- (panel izquierdo) y células K562 MSLN+ (panel derecho) combinadas con linfocitos T donantes que tienen formatos de TFP CD3ε, CD3γ, TCRβ y CD28ζ CAR. Se observaron resultados similares mediante el uso de un segundo donante de linfocitos T.

La **FIG. 10** muestra los resultados del análisis de FACS que demuestran la activación de linfocitos T que expresan construcciones de TFP y CAR anti-MSLN cuando se cocultivan con células MSLN+. Se tiñeron las células para detectar antígenos de superficie con APC anti-CD3 (compuerta) y APCcy7 anti-CD8 (ejes y) antes de fijar, permeabilizar y teñir con Alexafluor700 anti-Granzima B (ejes x). Tal como se muestra en la **FIG. 10A**, de izquierda a derecha, los linfocitos T no se transdijeron, se transdijeron con vector vacío, se transdijeron con TFP anti-MSLN-CD3ε, CAR anti-MSLN-28ζ o CAR anti-MSLN-41BBζ. Las células cocultivadas con células MSLN- se muestran en la fila superior y las cocultivadas con células objetivo MSLN+ se muestran en la fila inferior. Se activaron linfocitos T CD8 que expresan las construcciones de CAR y TFP anti-mesotelina mediante el cultivo con células MSLN+, según lo muestran los niveles elevados de GrB intracelular, en relación con el cocultivo con células MSLN- (**FIG. 10B**). Se muestra el porcentaje de células de granzima B (“GrB+”) para cada construcción, al cocultivar ya sea con MSLN- (barras blancas) o MSLN+ (barras negras).

La **FIG. 11** muestra los resultados del análisis de ELISA de producción de citocina en linfocitos T activados que expresan construcciones de TFP y CAR anti-MSLN cuando se cocultivan con células K562 que sobreexpresan MSLN. Se usaron células K562 que sobreexpresan BCMA como controles negativos. Después de 24 horas, las células se analizaron para detectar la expresión de IFN-γ (**FIG. 11A**) e IL-2 (**FIG. 11B**) mediante ELISA. En cada FIG., de izquierda a derecha, los linfocitos T no se transdijeron, se transdijeron con vector vacío, se transdijeron con TFP anti-MSLN-CD3ε, CAR anti-MSLN-28ζ o CAR anti-MSLN-41BBζ. Las células cocultivadas con células MSLN- se representan mediante barras blancas, y las cocultivadas con células objetivo MSLN+ se representan mediante barras negras.

La **FIG. 12** es una serie de gráficas que muestra la eficacia de linfocitos T de TFP sdAb específicos de MSLN *in vivo* en un modelo de ratón de xenoinjerto de mesotelioma. Los ratones se inocularon con MSTO-211H-FL-MSLN-Luc marcada con luciferasa a 1×10^6 células por ratón y se hicieron crecer los tumores hasta el volumen tumoral de aproximadamente 300 mm^3 , se inyectaron 1×10^7 células por vía intravenosa en cada animal. La **FIG. 12A** muestra el volumen tumoral después de la inyección con linfocitos T, que incluyen, de izquierda a derecha, un control sin linfocitos T, SD1 CD3ε-TFP y SD4 CD3ε-TFP. La **FIG. 12B** muestra TFP CD3γ- con SD1 y aglutinantes SD4 y SD1 CAR CD28ζ. La **FIG. 12C-D** muestra resultados de los ratones supervivientes de 12A-B que se volvieron a exponer a células tumorales para determinar si los ratones mantendrían su inmunidad anti-MSLN sin una segunda inyección de linfocitos T. A los ratones a los que se les había administrado linfocitos T de CD3ε-TFP SD1 (**12C**) y linfocitos T de CD3γ-TFP SD1 (**12D**) y cuyos tumores habían sido eliminados previamente se volvieron a inocular con líneas celulares tumorales MSLN+ (MSTO) o MSLN- (Raji). Se midió el volumen tumoral y se muestra en el eje x.

La FIG. 13 muestra la producción y análisis funcional de linfocitos T MSLN-TFP a partir de pacientes de cáncer de ovario. La FIG. 13A es un diagrama esquemático del diseño experimental. La FIG. 13B-C muestra la muerte *in vitro* de células tumorales MSTO-MSLN-Luc mediante linfocitos T ϵ -TFP SD1 de pacientes. Se confirmaron células tumorales MSTO-MSLN-Luc (células objetivo) para la expresión de mesotelina (13B); linfocitos T ϵ -TFP SD1 (células efectoras) y se agregaron controles no transducidos equivalentes a una proporción de E a T (efectora a objetivo) de 5 a 1, 1 a 1 o 1 a 5 durante 24 horas. La luminiscencia de las células objetivo se midió en unidades de luminiscencia relativa (RLU, por sus siglas en inglés) mediante un lector de placas SpectraMax® M5 (Molecular Devices). Cada línea en la figura representa el promedio de 3 duplicados (13C). Las FIG. 13D-L muestran la medición del perfil de citocina de linfocitos T ϵ -TFP SD1 a partir de pacientes de cáncer de ovario, que incluyen IFN γ (13D), GM-CSF (13E), Granzima A (13F), Granzima B (13G), IL-2 (13H), MIP-1 α (13I), MIP-1 β (13J), TNF α (13K) y perforina (13L). Las células tumorales MSTO-MSLN-Luc (células objetivo) se colocaron en placas a 10 000 células/pocillo en una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se agregaron linfocitos T ϵ -TFP SD1 (células efectoras) y controles no transducidos equivalentes a una proporción de 1 a 1 durante 24 horas. Los sobrenadantes celulares se recogieron y se midieron las citocinas mediante el uso de un ensayo Luminex®.

La FIG. 14 muestra la eficacia *in vivo* de linfocitos T CD3 ϵ -TFP SD1 derivados de pacientes en un modelo de ratón de xenoinjerto tumoral con alto nivel de MSLN. Las células MSTO-211H-FL MSLN-Luc se inocularon a 1×10^6 células por ratón por vía subcutánea. Diez días después de la inyección tumoral (volumen tumoral de ~200-300 mm 3), se inyectaron 5×10^6 linfocitos T por vía intravenosa en cada animal. Cada línea en la figura representa un único animal. Se muestran datos para linfocitos T de ND12 (14A), Paciente 1 (14B), Paciente 2 (14C), Paciente 3 (14D) y Paciente 4 (14E). Los círculos indican el tamaño tumoral en ratones inoculados con linfocitos T sin transducir; los cuadrados indican los inoculados con linfocitos T de TFP.

Descripción detallada

La invención se expone en las reivindicaciones.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aisladas comprenden (i) una cadena ligera (LC) CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos de dominio de unión de cadena ligera anti-mesotelina que se proporcione en la presente, y/o (ii) una cadena pesada (HC) CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos de dominio de unión de cadena pesada anti-mesotelina que se proporcione en la presente.

En algunas modalidades, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la presente, o una secuencia con 95-99 % de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la presente. En otras modalidades, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la presente, o una secuencia con 95-99 % de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la presente.

La TFP incluye un dominio extracelular de una subunidad de TCR que comprende un dominio extracelular, o una parte de este, de una proteína CD3 épsilon o un fragmento funcional de esta, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones en estas. La TFP codificada incluye un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína CD3 épsilon, o un fragmento funcional de esta, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones en estas.

La TFP codificada incluye un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína CD3 épsilon, o un fragmento funcional de esta, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones en esta.

El dominio de unión a anti-mesotelina codificado se conecta al dominio extracelular de TCR mediante una secuencia enlazadora. En algunos casos, la secuencia enlazadora codificada comprende (G_nS)_n, donde n=1 a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora codificada comprende una secuencia enlazadora larga (LL, por sus siglas en inglés). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga codificada comprende (G_nS)_n, donde n=2 a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora codificada comprende una secuencia enlazadora corta (SL, por sus siglas en inglés). En algunos casos, la secuencia enlazadora corta codificada comprende (G_nS)_n, donde n=1 a 3.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aislado comprenden además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En algunos casos, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional obtenido de una proteína que se selecciona del grupo que consiste en DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137), o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones en esta.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico aislado comprenden además una secuencia líder.

También se proporcionan en la presente moléculas de polipéptidos aisladas, codificadas por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente.

5 También se describen en la presente, en otro aspecto, moléculas aisladas de proteína de fusión del receptor de linfocitos T (TFP) que comprenden un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. En algunas modalidades, las moléculas de TFP aisladas comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio intracelular.

10

El dominio de unión a anti-mesotelina es un scFv o un ScAb, tal como un dominio VH. En otras modalidades, el dominio de unión a anti-mesotelina comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la presente, o un fragmento funcional de esta, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la presente, o una secuencia con 95-99 % de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la presente.

15 20 Las moléculas de TFP aisladas comprenden un dominio extracelular de TCR que comprende un dominio extracelular, o una parte de este, de una proteína CD3 épsilon o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones en esta.

25 30 El dominio de unión a anti-mesotelina se conecta al dominio extracelular de TCR mediante una secuencia enlazadora. En algunos casos, la región enlazadora comprende (G_nS)_n, donde n=1 a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora larga (LL). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga comprende (G_nS)_n, donde n=2 a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora corta (SL). En algunos casos, la secuencia enlazadora corta comprende (G_nS)_n, donde n=1 a 3.

35 40 En algunas modalidades, las moléculas de TFP aisladas comprenden además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. Las moléculas de TFP aisladas comprenden una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular. En aun otras modalidades, las moléculas de TFP aisladas comprenden además una secuencia líder.

45 50 También se proporcionan en la presente vectores que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de las moléculas de TFP mencionadas anteriormente. En algunas modalidades, el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, un vector adenoviral o un vector de retrovirus. En algunas modalidades, el vector comprende además un promotor. En algunas modalidades, el vector es un vector transrito *in vitro*. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una cola de poli(A). En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una UTR 3'.

55 60 También se proporcionan en la presente células que comprenden cualquiera de los vectores descritos. En algunas modalidades, la célula es un linfocito T humano. En algunas modalidades, la célula es un linfocito T CD8+ o CD4+. En otras modalidades, las células comprenden además un ácido nucleico que codifica una molécula inhibidora que comprende un primer polipéptido que comprende al menos una parte de una molécula inhibidora, que se asocia con un segundo polipéptido que comprende una señal positiva de un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, la molécula inhibidora comprende un primer polipéptido que comprende al menos una parte de PD1 y un segundo polipéptido que comprende un dominio coestimulador y un dominio de señalización primario.

65 70 Se describen en la presente moléculas de TFP aisladas que comprenden un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde la molécula de TFP es capaz de interactuar de forma funcional con un complejo endógeno de TCR y/o al menos un polipéptido endógeno de TCR.

75 80 Se describen en la presente moléculas de TFP aisladas que comprenden un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde la molécula de TFP es capaz de integrarse de forma funcional al complejo endógeno de TCR.

85 90 En otro aspecto, se proporcionan en la presente linfocitos T CD8+ o CD4+ humanos que comprenden al menos dos moléculas de TFP de la invención, donde la molécula de TFP es capaz de interactuar de forma funcional con un complejo endógeno de TCR y/o al menos un polipéptido endógeno de TCR dentro, en y/o sobre la superficie del linfocito T CD8+ o CD4+ humano.

95 100 Se describen en la presente complejos de proteínas que comprenden i) una molécula de TFP que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio intracelular; y ii) al menos un complejo endógeno de TCR.

- El TCR comprende un dominio extracelular, o parte de este, de una CD3 épsilon. El dominio de unión a anti-mesotelina se conecta al dominio extracelular de TCR mediante una secuencia enlazadora. En algunos casos, la región enlazadora comprende $(G_4S)_n$, donde $n=1$ a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora larga (LL). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga comprende $(G_4S)_n$, donde $n=2$ a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora corta (SL). En algunos casos, la secuencia enlazadora corta comprende $(G_4S)_n$, donde $n=1$ a 3.
- 5 También se describen en la presente linfocitos T humanos CD8+ o CD4+ que comprenden al menos dos proteínas de TFP diferentes por cada uno de cualquiera de los complejos de proteínas descritos.
- 10 Se describe en la presente una población de linfocitos T humanos CD8+ o CD4+, donde los linfocitos T de la población comprenden, de forma individual o conjunta, al menos dos moléculas de TFP, donde las moléculas de TFP comprenden un dominio de unión a anti-mesotelina, humano o humanizado, un dominio extracelular de TCR, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, donde la molécula de TFP es capaz de interactuar de forma funcional con un complejo endógeno de TCR y/o al menos un polipéptido endógeno de TCR dentro, en y/o sobre la superficie del linfocito T humano CD8+ o CD4+.
- 15 Se describe en la presente una población de linfocitos T humanos CD8+ o CD4+, donde los linfocitos T de la población comprenden, de forma individual o conjunta, al menos dos moléculas de TFP codificadas por una molécula de ácido nucleico aislado proporcionada en la presente.
- 20 Se describen en la presente métodos para crear una célula que comprenden la transducción de un linfocito T con cualquiera de los vectores descritos.
- 25 Se describen en la presente métodos para generar una población de células con modificación de ARN que comprenden la introducción de un ARN transcrit *in vitro* o ARN sintético en una célula, donde el ARN comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de las moléculas de TFP descritas.
- 30 Se describen en la presente métodos para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una célula que exprese cualquiera de las moléculas de TFP descritas. En algunas modalidades, la célula es un linfocito T autólogo. En algunas modalidades, la célula es un linfocito T alogénico. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano.
- 35 La invención proporciona productos para su uso en el tratamiento de un mamífero que padece una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina, que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz del linfocito que comprende cualquiera de las moléculas de TFP descritas. En algunas modalidades, la enfermedad asociada con la expresión de mesotelina se selecciona de una enfermedad proliferativa, tal como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa, tal como un cáncer de páncreas, un cáncer de ovario, un cáncer de 40 estómago, un cáncer de pulmón o un cáncer de endometrio, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de mesotelina.
- 45 En algunas modalidades, las células que expresan cualquiera de las moléculas de TFP descritas se administran combinadas con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de TFP. En algunas modalidades, las células que expresan cualquiera de las moléculas de TFP descritas se administran combinadas con un agente que trata la enfermedad asociada con mesotelina.
- 50 También se proporcionan en la presente cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas, cualquiera de las moléculas de polipéptidos aisladas, cualquiera de las TFP aisladas descritas, cualquiera de los complejos de proteínas descritos, cualquiera de los vectores descritos o cualquiera de las células descritas para su uso como un medicamento.
- Definiciones**
- 55 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.
- 60 Los términos "un" y "uno" se refieren a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o más de un elemento.
- 65 Tal como se usa en la presente, "alrededor de" puede significar más o menos de 1 o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más de 30 por ciento, según la situación y si el experto en la técnica lo sabe o lo puede saber.
- Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "sujeto" o "sujetos" o "individuos" puede incluir, de modo no taxativo, mamíferos, tales como seres humanos o mamíferos no humanos, por ejemplo, animales domesticados, para la agricultura o salvajes, así como aves y animales acuáticos. "Pacientes" son sujetos que padecen o corren riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección u otros, que necesiten las composiciones y métodos

que se proporcionan en la presente.

Tal como se usa en la presente, "tratar" o "tratamiento" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la mejora de una enfermedad o afección. Tratar puede incluir, por ejemplo, reducir, retrasar o aliviar la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad o afección, o puede incluir la reducción de la frecuencia con la cual un paciente experimenta los síntomas de una enfermedad, defecto, trastorno o condición adversa, y similares. Tal como se usa en la presente, "tratar o prevenir" se usa a veces en la presente para hacer referencia a un método que produce algún nivel de tratamiento o mejora de la enfermedad o afección, y contempla un intervalo de resultados orientados a ese fin, inclusive, de modo no taxativo, la prevención de una afección en su totalidad.

Tal como se usa en la presente, "prevenir" se refiere a la prevención de la enfermedad o afección, por ejemplo, la formación de tumores, en el paciente. Por ejemplo, si un individuo en riesgo de desarrollar un tumor u otra forma de cáncer es tratado con los métodos de la presente invención y no desarrolla después el tumor u otra forma de cáncer, entonces se ha preventido la enfermedad, al menos durante un período de tiempo, en ese individuo.

Tal como se usa en la presente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de una composición, o un componente activo de esta, suficiente para proporcionar un efecto beneficioso o para reducir de otro modo un evento perjudicial al individuo a quien se le administra la composición. En la presente, "dosis terapéuticamente eficaz" significa una dosis que produce uno o más efectos deseados o deseables (por ejemplo, beneficiosos) para los cuales se administra, donde tal administración se da una o más veces durante un período de tiempo determinado. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento y un experto en la técnica podrá verificarla mediante el uso de técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); y Pickar, *Dosage Calculations* (1999))

Tal como se usa en la presente, una "proteína de fusión del receptor de linfocitos T (TCR)" o "TFP" incluye un polipéptido recombinante derivado de diversos polipéptidos que comprenden el TCR, que en general es capaz de i) unirse a un antígeno de superficie en las células objetivo y ii) interactuar con otros componentes de polipéptidos del complejo intacto de TCR, normalmente cuando se coubica en o sobre la superficie de un linfocito T. Un "linfocito T de TFP" es un linfocito T que se ha transducido (por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en la presente) y que expresa una TFP, por ejemplo, incorporada en el TCR natural. En algunas modalidades, el linfocito T es un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+ o un linfocito T CD4+/CD8+. En algunas modalidades, el linfocito T de TFP es una célula NK. En algunas modalidades, el linfocito T es un linfocito T gamma-delta.

Tal como se usa en la presente, el término "mesotelina", también conocida como MSLN o antígeno CAK1 o pre-pro-factor de potenciación de megacariocitos, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen de MSLN (o factor de potenciación de megacariocitos (MPF, por sus siglas en inglés)). La mesotelina es una proteína de 40 kDa presente en células mesoteliales normales y se sobreexpresa en varios tumores humanos, que incluyen el mesotelioma y adenocarcinoma de ovario y páncreas. El gen de mesotelina codifica una proteína precursora que se procesa para producir mesotelina, que se acopla a la membrana celular mediante un enlace de glicofosfatidilinositol y un fragmento diseminado de 31 kDa llamado factor de potenciación de megacariocitos (MPF). La mesotelina puede estar implicada en la adhesión celular, pero su función biológica no es conocida. La mesotelina es un antígeno de diferenciación tumoral que está presente normalmente en las células mesoteliales que recubren la pleura, peritoneo y pericardio. La mesotelina es un determinante antigénico detectable en células de mesotelioma, células de cáncer de ovario, células de adenocarcinoma de páncreas y algunos carcinomas de células escamosas (véase, por ejemplo, Kojima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:21984-21990(1995) y Onda *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 12:4225-4231(2006)). La mesotelina interactúa con CA125/MUC16 (véase, por ejemplo, Rump *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:9190-9198(2004) y Ma *et al.*, *J. Biol. Chem.* 287:33123-33131(2012)).

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en bases de datos públicas, tal como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de mesotelina humana se puede encontrar como el n.º de registro de UniProt/Swiss-Prot Q13421. La secuencia canónica de polipéptido de mesotelina humana es el n.º de registro de UniProt Q13421 (o Q13421-1):

MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLSLGVVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQ
 LLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDA
 FSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSSLSEADVRALGGLACDLPG
 RFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPSTWSVSTM DALRGLLPVLGQP
 IIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEA
 CVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWN
 VTSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPVATLIDRFVKGRGQLDKDTLTLTAFYPGYLCSL
 SPEELSSVPPSSIWAVRPQDLTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLK
 ALSQQNVSMIDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDL
 DTLGLGLQGGIPNGYLVLDSMQUEALSGTPCLLGPVLTVALLLASTLA (SEQ ID NO:15).

La secuencia de nucleótidos que codifica la variante 1 de transcripto de mesotelina humana puede hallarse en el n.º de acceso NM005823 La secuencia de nucleótidos que codifica la variante 2 de transcripto de mesotelina humana puede hallarse en el n.º de acceso NM013404 La secuencia de nucleótidos que codifica la variante 3 de transcripto de mesotelina humana puede hallarse en el n.º de acceso NM001177355 La mesotelina se expresa en células de mesotelioma, células de cáncer de ovario, células de adenocarcinoma de páncreas y carcinomas de células escamosas (véase, por ejemplo, Kojima *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:21984-21990(1995) y Onda *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 12:4225-4231(2006)). Se proporcionan más adelante otras células que expresan mesotelina en la definición de "enfermedad asociada con la expresión de mesotelina". La mesotelina también interactúa con CA125/MUC16 (véase, por ejemplo, Rump *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:9190-9198(2004) y Ma *et al.*, *J. Biol. Chem.* 287:33123-33131(2012)). En un ejemplo, la parte de unión al antígeno de TFP reconoce y se une a un epítopo dentro del dominio extracelular de la proteína de mesotelina tal como se expresa en una célula de mesotelioma normal o maligna, célula de cáncer de ovario, célula de adenocarcinoma de páncreas o célula de carcinoma de células escamosas.

El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente, se refiere a secuencias de proteína o de polipéptido derivadas de una molécula de inmunoglobulina, que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas de origen polyclonal o monoclonal, o fragmentos de estas, y pueden derivar de fuentes naturales o recombinantes.

Las expresiones "fragmento de anticuerpo" o "dominio de unión al anticuerpo" se refieren a al menos una parte de un anticuerpo, o variantes recombinantes de esta, que contiene el dominio de unión al antígeno, es decir, una región variable determinante antigénica de un anticuerpo intacto, que sea suficiente para conferir reconocimiento y unión específica del fragmento de anticuerpo a un objetivo, tal como un antígeno y su epítopo definido. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, fragmentos de anticuerpo de cadena simple (scFv) ("scFv"), anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio simple (abreviados "sdAb") (ya sea V_L o V_H), dominios de camélidos V_{HH} y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, donde las regiones variables de cadena ligera y pesada se unen de forma contigua mediante un enlazador polipeptídico corto flexible, y capaz de expresarse como una cadena polipeptídica simple, y donde scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del cual deriva.

"Región variable de cadena pesada" o "V_H" (o, en el caso de anticuerpos de dominio simple, por ejemplo, nanocuerpos, "V_{HH}") con respecto a un anticuerpo se refieren al fragmento de la cadena pesada que contiene tres CDR interpuestas entre las extensiones flanqueantes conocidas como regiones marco, donde estas regiones marco por lo general se conservan mejor que las CDR y forman una estructura que da soporte a las CDR.

A menos que se especifique, tal como se usa en la presente un scFv puede tener las regiones variables V_L y V_H en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos terminales N y C del polipéptido, el scFv puede comprender V_L-enlazador-V_H o puede comprender V_H-enlazador-V_L.

La parte de la composición de TFP de la invención que comprende un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de este, puede existir en una diversidad de formas donde el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena de polipéptidos contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio simple (sdAb) o anticuerpos de cadena pesada HCAb, un anticuerpo de cadena simple (scFv) derivado de un anticuerpo murino, humanizado o humano (Harlow *et al.*, 1999, en: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow *et al.*, 1989, en: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426). En un aspecto, el dominio de unión al antígeno de una composición de TFP de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, la TFP comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv o un sdAb.

La expresión "cadena pesada de anticuerpo", se refiere a la más grande de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales y que determina normalmente la clase a la cual pertenece el anticuerpo.

La expresión "cadena ligera de anticuerpo" se refiere a la más pequeña de dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras kappa ("κ") y lambda ("λ") se refieren a los dos isotipos principales de cadena ligera de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera mediante el uso de tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un sistema de expresión de bacteriófagos o levaduras. También debe interpretarse que la expresión significa un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, donde el ADN o la secuencia de aminoácidos se obtuvo mediante el uso de tecnología de ADN recombinante o de secuencia de aminoácidos que se encuentra disponible y es conocida en la técnica.

El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que es capaz de unirse específicamente mediante un anticuerpo o que provoca de otro modo una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar ya sea la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la técnica comprenderá que cualquier macromolécula, inclusive prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivar de ADN recombinante o genómico.

Un experto en la técnica comprenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia parcial de nucleótidos que codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria codifica por tanto un "antígeno", tal como se usa tal término en la presente. Además, el experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Resulta muy evidente que la presente invención incluye, de modo no taxativo, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos se disponen en diversas combinaciones para codificar los polipéptidos que provocan la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Resulta evidente que se puede generar un antígeno sintetizado o puede derivar de una muestra biológica o puede ser una macromolécula además de un polipéptido. Tal muestra biológica puede incluir, de modo no taxativo, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido con otros componentes biológicos.

La expresión "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar mediante diversos medios, inclusive, de modo no taxativo, por ejemplo, una disminución en el volumen tumoral, una disminución en la cantidad de células tumorales, una disminución en la cantidad de metástasis, un aumento en la expectativa de vida, una disminución en la proliferación de células tumorales, una disminución en la supervivencia de las células tumorales o una mejora de los diversos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar mediante la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la aparición de tumores en primer lugar.

El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al cual se volverá a introducir después.

El término "alógénico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie o diferente paciente que el individuo al cual se introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alógénicos entre sí cuando los genes en uno o más locus no son idénticos. En algunos aspectos, el material alógénico de los individuos de la misma especie puede ser suficientemente diferente genéticamente para interactuar de forma antigénica.

El término "xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

La expresión "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido y descontrolado de células anómalas. Las células cancerosas pueden extenderse de forma local o mediante el flujo sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Se describen ejemplos de diversos cánceres en la presente e incluyen, de modo no taxativo, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, cáncer de pulmón y similares.

La frase "enfermedad asociada con la expresión de mesotelina" incluye, de modo no taxativo, una enfermedad que se asocia con la expresión de mesotelina o una afección asociada con células que expresan mesotelina, que incluyen, por ejemplo, enfermedades proliferativas tales como un cáncer o neoplasia maligna o una afección precancerosa. En un aspecto, el cáncer es mesotelioma. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de páncreas. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de ovario. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de estómago. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de pulmón. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de endometrio. Los síntomas no relacionados con cáncer asociados con la expresión de mesotelina incluyen, por ejemplo, de modo no taxativo, enfermedades autoinmunitarias, (por ejemplo, lupus, artritis reumatoide, colitis), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes.

La expresión "modificaciones de secuencia conservadoras" se refiere a las modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Es posible introducir modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido las familias de residuos 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 sin carga (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, uno o más residuos de aminoácidos dentro de una TFP de la invención pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y se puede analizar la TFP alterada mediante el uso de los ensayos funcionales descritos en la presente.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de un dominio estimulador o una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afín, lo que de este modo media en un evento de transducción de señal, tal como, de modo no taxativo, la transducción de señales mediante el complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de determinadas moléculas y/o la reorganización de las estructuras citoesqueléticas y similares.

Las expresiones "molécula estimuladora" o "dominio estimulador" se refieren a una molécula, o una parte de esta, expresada por un linfocito T que proporciona la o las secuencias de señalización citoplasmática primaria que regulan la activación primaria del complejo TCR de un modo estimulador para al menos algunos aspectos de la vía de señalización de linfocitos T. En un aspecto, la señal primaria se inicia mediante, por ejemplo, la unión de un

complejo TCR/CD3 con una molécula MHC cargada con péptidos y que conduce a la mediación de una respuesta de los linfocitos T, inclusive, de modo no taxativo, la proliferación, la activación, la diferenciación y similares. Una secuencia de señalización citoplasmática primaria (a la que también se hace referencia como "dominio de señalización primaria") que actúa de una forma estimuladora puede contener un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina o "ITAM". Los ejemplos de un ITAM que contiene la secuencia de señalización citoplasmática primaria que resulta particularmente útil en la invención incluye, de modo no taxativo, aquellas derivadas de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS") y CD66d.

La expresión "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a una célula del sistema inmunitario, tal como una célula accesoria (por ejemplo, un linfocito B, una célula dendrítica y similares) que presenta un antígeno extraño en complejo con complejos principales de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en su superficie. Los linfocitos T pueden reconocer estos complejos mediante el uso de sus receptores de linfocitos T (TCR). Las APC procesan antígenos y los presentan a los linfocitos T.

Un "dominio de señalización intracelular", tal como se usa el término en la presente, se refiere a una parte intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular genera una señal que promueve una función efectora inmunitaria de la célula que contiene TFP, por ejemplo, un linfocito T que expresa TFP. Los ejemplos de función efectora inmunitaria, por ejemplo, en un linfocito T que expresa TFP, incluyen la actividad citolítica y la actividad de los linfocitos T auxiliares, inclusive la secreción de citocinas. En una modalidad, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario. Los ejemplos de dominios de señalización intracelular primarios incluyen aquellos derivados de moléculas responsables de la estimulación primaria, o estimulación dependiente de antígenos. En una modalidad, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Los ejemplos de dominios de señalización intracelular coestimuladores incluyen aquellos derivados de moléculas responsables de las señales coestimuladoras o estimulación independiente de los antígenos.

Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender un ITAM ("motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina"). Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen, de modo no taxativo, las derivadas de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d DAP10 y DAP12.

La expresión "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, lo que media de este modo en una respuesta coestimuladora mediante el linfocito T, tal como, de modo no taxativo, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular que no sean receptores antigenicos ni sus ligandos, que se requieren para una respuesta inmunitaria eficiente. Las moléculas coestimuladoras incluyen, de modo no taxativo una molécula del MHC de clase 1, BTLA y un receptor de ligando tipo Toll, así como DAP10, DAP12, CD30, LIGHT, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137). Un dominio de señalización intracelular coestimulador puede ser la parte intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora puede representarse en las siguientes familias de proteínas: proteínas receptoras de TNF, proteínas tipo inmunoglobulina, receptores de citocina, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM, por sus siglas en inglés) y receptores de activación de células NK. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, antígeno 1 asociado con la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares. El dominio de señalización intracelular puede comprender la parte intracelular total, o el dominio de señalización intracelular natural total, de la molécula de la cual deriva, o un fragmento funcional de esta. El término "4-1BB" se refiere a un miembro de la superfamilia de TNFR con una secuencia de aminoácidos que se proporciona como el n.º de registro de GenBank AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, de ratón, roedor, mono, simio y similares; y un "dominio coestimulador 4-1BB" se define como los residuos de aminoácidos 214-255 del n.º de registro de GenBank AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, de ratón, roedor, mono, simio y similares.

La expresión "que codifica" se refiere a la propiedad inherente de las secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para funcionar como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, ARNr, ARNr y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas producidas por estos. Por lo tanto, un gen, ADNc o ARN 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 de codificación, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y usualmente se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, usada como la plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden designarse como que codifican la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Salvo que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas la una de la otra y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener, en alguna versión, uno o más intrones.

Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan de forma indistinta en la presente y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, tal como se describe en la presente, eficaz para lograr un resultado biológico o terapéutico particular.

El término "endógeno" se refiere a cualquier material de un organismo, célula, tejido o sistema, o producido dentro

de estos.

El término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido desde un organismo, célula, tejido o sistema, o producido fuera de estos.

5 El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos en particular impulsada por un promotor.

10 La expresión "vector de transferencia" se refiere a 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. Se conocen numerosos vectores en la técnica, inclusive, de modo no taxativo, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfíflicos, plásmidos y virus. Por tanto, la expresión "vector de transferencia" incluye un plásmido o virus que se replica de forma autónoma. La expresión también debe comprenderse como que incluye además compuestos que no son plásmidos ni virales, que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tal como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, liposoma, y similares. Los ejemplos de vectores de transferencia virales incluyen, de modo no taxativo, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

15 15 La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante, que comprende las secuencias de control de expresión unidas de forma operativa a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión se pueden proporcionar mediante la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, inclusive cósmidos, 20 plásmidos (por ejemplo, desnudo o contenido en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

25 El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden proporcionar una cantidad significativa de información genética al ADN de la célula hospedadora, por lo que son uno de los métodos más eficientes de vector de administración de gen. El VIH, VIS y VIF son todos ejemplos de lentivirus.

30 30 La expresión "vector lentiviral" se refiere a un vector derivado de al menos una parte de un genoma de lentivirus, que incluye especialmente un vector lentiviral autoinactivante tal como se proporciona en Milone *et al.*, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores de lentivirus que se pueden usar en la clínica incluyen, de modo no taxativo, por ejemplo, la tecnología de administración de genes LENTIVECTOR™ de Oxford BioMedica, el sistema de vector LENTIMAX™ de Lentigen y similares. Los tipos no clínicos de vectores lentivirales también se encuentran disponibles y serían conocidos para el experto en la técnica.

35 35 Los términos "homólogo" o "identidad" se refieren a la identidad de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas es ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN es ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias está directamente en función de la cantidad de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero con una longitud de diez subunidades) de las posiciones en las dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50 % homólogas; si el 90 % de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) coinciden o son homólogas, las dos secuencias son 90 % homólogas.

40 40 Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de estas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ u otras secuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados y los fragmentos de anticuerpo de estos son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o fragmento de anticuerpo) en las cuales los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) del receptor se remplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de región marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, un anticuerpo/fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias de marco importadas. Estas modificaciones pueden refinar adicionalmente y optimizar el rendimiento del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado, o fragmento de anticuerpo de este, comprenderá considerablemente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los cuales todas o considerablemente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o una parte significativa de las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, o fragmento de anticuerpo, también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), comúnmente la de una inmunoglobulina humana. Por detalles adicionales, véase Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

45 60 "Humano" o "totalmente humano" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde la molécula total es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o inmunoglobulina.

55 65 El término "aislado" significa alterado o extraído de su estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o péptido natural presente en un animal vivo no se encuentra "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o totalmente de los materiales coexistentes de su estado natural se encuentra "aislado". Una proteína o ácido nucleico aislado puede existir en una forma considerablemente purificada o puede existir en un entorno no

natural tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

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

5 La expresión "unido/a de forma operativa" o "control transcripcional" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da lugar a la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico se enlaza de forma operativa con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando se pone la primera secuencia de ácido nucleico en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido de manera operativa a una secuencia de codificación si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Las secuencias de ADN unidas de forma operativa pueden encontrarse unas junto a otras y, por ejemplo, cuando es necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, se encuentran en el mismo marco de lectura.

10 La expresión administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, técnicas de infusión o intratumoral.

15 15 Las expresiones "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refieren a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de estos, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite de manera específica, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que poseen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico en particular también abarca de manera implícita las variantes modificadas de manera conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como también la secuencia indicada de manera explícita. De manera específica, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

20 20 25 25 30 30 35 35 40 40 45 45 50 50 55 55 60 60 65 65 Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable, y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácidos unidos de forma covalente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita la cantidad máxima de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen todo péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Tal como se usa en la presente, el término hace referencia tanto a cadenas cortas, a las que también se hace referencia comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, a las que por lo general se hace referencia en la técnica como proteínas, de las cuales 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. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de estos.

30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 101

larga (LL). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga comprende (G₄S)_n, donde n=2 a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora corta (SL). En algunos casos, la secuencia enlazadora corta comprende (G₄S)_n, donde n=1 a 3.

5 Tal como se usa en la presente, un casquete 5' (también denominado un casquete de ARN, un casquete de 7-metilguanosina de ARN o un casquete m7G de ARN) es un nucleótido guanina modificado que se ha añadido a la parte "delantera" o extremo 5' de un ARN mensajero eucariota poco después del inicio de la transcripción. El casquete 5' consiste de un grupo terminal que se enlaza al primer nucleótido transcrita. Su presencia es fundamental para el reconocimiento por parte del ribosoma y la protección de RNAs. La adición de casquete se acopla a la transcripción y sucede de forma cotranscripcional, de modo que se influyan entre sí. Poco después del inicio de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que se esté sintetizando se une mediante un complejo de sintetización de casquete asociado con la ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas que son necesarias para la generación de casquitos de ARNm. La síntesis se produce como una reacción bioquímica de múltiples etapas. El resto de generación de casquitos se puede modificar para modular la funcionalidad del ARNm, tal como su estabilidad o eficiencia de traducción.

10 15 Tal como se usa en la presente, "ARN transcrita *in vitro*" se refiere al ARN, preferentemente ARNm, que se ha sintetizado *in vitro*. Por lo general, el ARN transcrita *in vitro* se genera a partir de un vector de transcripción *in vitro*. El vector de transcripción *in vitro* comprende una plantilla que se usa para generar el ARN transcrita *in vitro*.

20 25 Tal como se usa en la presente, "poli(A)" es una serie de adenosinas unidas por poliadenilación al ARNm. En la modalidad preferida de una construcción para expresión transitoria, el poliA se encuentra entre 50 y 5000, preferentemente mayor de 64, más preferentemente mayor de 100, más preferentemente mayor de 300 o 400. Las secuencias poli(A) se pueden modificar de forma química o enzimática para modular la funcionalidad del ARNm, tal como la localización, la estabilidad o la eficiencia de traducción.

30 35 Tal como se usa en la presente, "poliadenilación" se refiere al enlace covalente de un resto poliadenilico, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En organismos eucariotas, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) son poliadeniladas en el extremo 3'. La cola poli(A) en 3' es una secuencia larga de nucleótidos adenina (frecuentemente varios cientos) que se agrega al pre-ARNm mediante la acción de una enzima, la poliadenilato polimerasa. En eucariotas superiores, la cola poli(A) se agrega en transcripciones que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli(A) y la proteína unida a esta ayudan en la protección del ARNm de la degradación por exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm desde el núcleo y la traducción. La poliadenilación sucede en el núcleo inmediatamente después de la transcripción del ADN en ARN, pero adicionalmente también puede suceder después en el citoplasma. Después de que haya terminado la transcripción, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasa asociado con la ARN polimerasa. El sitio de escisión se caracteriza normalmente por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Después de haberse escindido el ARNm, se agregan residuos de adenosina al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

40 45 Tal como se usa en la presente, "transitorio" se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un período de horas, días o semanas, donde el período de tiempo de expresión es menor que el período de tiempo para la expresión del gen si se integra en el genoma o está contenido dentro de un replicón de plásmido estable en la célula hospedadora.

50 55 El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los cuales se pueda provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos, seres humanos).

55 60 La expresión "vía de transducción de señal" se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señal que desempeñan una función en la transmisión de una señal de una parte de una célula a otra parte de una célula. La expresión "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir la señal a través de la membrana de una célula.

60 65 El término "terapéutico", tal como se usa en la presente, significa un tratamiento. Un efecto terapéutico se obtiene mediante la reducción, supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

65 70 El término "profilaxis", tal como se usa en la presente, significa la prevención o el tratamiento protector para una enfermedad o un estado de enfermedad.

70 75 En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refieren a antígenos que son comunes para trastornos hiperproliferativos específicos. En determinados aspectos, los antígenos de trastornos hiperproliferativos de la presente invención derivan de cánceres que incluyen, de modo no taxativo, melanoma primario o metastásico, mesotelioma, carcinoma de células renales, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer cerebral, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, de endometrio y de estómago.

75 80 En algunos casos, la enfermedad es un cáncer que se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, adenocarcinoma de ovario seroso papilar, carcinoma de ovario de células claras, carcinoma de ovario mülleriano

mixto, carcinoma de ovario mucinoso endometrioide, enfermedad pleural maligna, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de páncreas ductal, carcinoma seroso uterino, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma del conducto biliar extrahepático, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma de esófago, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma de mama, una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina y combinaciones de estas, una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina y combinaciones de estas.

5 Los términos "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refieren 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 del sujeto primario y su descendencia.

10 La expresión "se une específicamente" se refiere a un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un ligando específico, que reconoce y se une a un compañero de unión afín (por ejemplo, mesotelina) presente en una muestra, pero que no reconoce considerablemente o se une a otras moléculas en la muestra, aunque no necesariamente.

15 Intervalos: a lo largo de la presente descripción, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalos se proporciona como tal con fines de conveniencia y brevedad y no debe considerarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo tiene todos los subintervalos posibles específicamente descritos, así como los valores numéricos individuales dentro de dicho intervalo. Por ejemplo, 20 debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene específicamente los subintervalos descritos, 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. A modo de otro ejemplo, un intervalo tal como 95-99 % de identidad incluye algo con 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad e incluye subintervalos tales como 96-99 %, 96-98 %, 96-97 %, 97-99 %, 97-98 % y 98-99 % de identidad. Esto es aplicable sin importar la amplitud del intervalo.

25

DESCRIPCIÓN

En la presente se proporcionan composiciones de materia y su uso para el tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer, mediante el uso de proteínas de fusión del receptor de linfocitos T (TCR). Tal como se usa en la presente, 30 una "proteína de fusión del receptor de linfocitos T (TCR)" o "TFP" incluye un polipéptido recombinante derivado de los diversos polipéptidos que comprenden el TCR, que en general es capaz de i) unirse a un antígeno de superficie en las células objetivo y ii) interactuar con otros componentes de polipéptidos del complejo intacto de TCR, normalmente cuando se cubica en o sobre la superficie de un linfocito T. Tal como se proporciona en la presente, las TFP proporcionan beneficios considerables en comparación con los receptores de antígenos químicos. La expresión 35 "receptor de antígeno químico" o, de forma alternativa, "CAR" se refiere a un polipéptido recombinante que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular en forma de un scFv, un dominio transmembrana y dominios de señalización citoplasmática (a los que también se hace referencia como "dominios de señalización intracelular") que comprenden un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora tal como se define más adelante. Por lo general, el dominio de señalización intracelular central de un CAR deriva de la cadena CD3 zeta que 40 se encuentra normalmente asociada con el complejo TCR. El dominio de señalización de CD3 zeta puede fusionarse con uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora tal como 4-1BB (es decir, CD137), CD27 y/o CD28.

Proteínas de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR)

45 La presente invención abarca construcciones de ADN recombinante que codifican TFP, donde la TFP comprende un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a mesotelina, por ejemplo, mesotelina humana, donde la secuencia del fragmento de anticuerpo se encuentra contigua y en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica una subunidad de TCR, o una parte de esta. Las TFP que se proporcionan en la presente 50 son capaces de asociarse con una o más subunidades de TCR endógenas (o, alternativamente, una o más subunidades exógenas o una combinación de endógenas y exógenas) para formar un complejo de TCR funcional.

En un aspecto, la TFP de la invención comprende un elemento de unión específica del objetivo al que se hace referencia de otro modo como un dominio de unión al antígeno como se expone en las reivindicaciones.

55 La parte de la TFP que comprende el dominio de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno que se dirige a mesotelina. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno se dirige a mesotelina humana.

60 El dominio de unión al antígeno de la TFP comprende residuos humanos o humanizados para el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

65 Por tanto, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo humanizado o humano. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado descrito en la presente, y/o una

o más (por ejemplo, las tres) región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado descrito en la presente, por ejemplo, un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado descrito en la presente, por ejemplo, el dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado tiene dos regiones variables de cadena pesada, donde cada una comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descrita en la presente. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado comprende una región variable de cadena ligera humanizada o humana descrita en la presente y/o una región variable de cadena pesada humanizada o humana descrita en la presente. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina humanizado o humano comprende una región variable de cadena pesada humanizada, por ejemplo, al menos dos regiones variables de cadena pesada humanizadas o humanas descritas en la presente. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la presente. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la presente, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos proporcionada en la presente; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada que se proporciona en la presente, o una secuencia con 95-99 % de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos proporcionada en la presente. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente se une a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente, mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en la presente. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina humano o humanizado incluye un enlazador (Gly₄-Ser)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente 3 o 4. La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden encontrarse, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora larga (LL). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga comprende (G₄S)_n, donde n=2 a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora corta (SL). En algunos casos, la secuencia enlazadora corta comprende (G₄S)_n, donde n=1 a 3.

En algunos aspectos, se humaniza un anticuerpo no humano, donde las secuencias o regiones específicas del anticuerpo se modifican para aumentar la similitud respecto a un anticuerpo producido de forma natural en un ser humano, o fragmento de este. En un aspecto, se humaniza el dominio de unión al antígeno.

Es posible producir un anticuerpo humanizado mediante el uso de una diversidad de métodos conocidos en la técnica, inclusive, de modo no taxativo, injertos de CDR (véase, por ejemplo, la patente europea n.º EP 239.400; la publicación internacional n.º WO 91/09967; y las patentes estadounidenses n.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o remodelación de superficie (véase, por ejemplo, las patentes europeas n.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; y Roguska *et al.*, 1994, PNAS, 91:969-973), traspisión de cadena (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.565.332) y las técnicas descritas, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US2005/0042664, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US2005/0048617, la patente estadounidense n.º 6.407.213, la patente estadounidense n.º 5.766.886, la publicación internacional n.º WO 9317105, Tan *et al.*, J. Immunol., 169:1119-25 (2002), Caldas *et al.*, Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea *et al.*, Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca *et al.*, J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997), Roguska *et al.*, Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto *et al.*, Cancer Res., 55 (23 Sup):5973s-5977s (1995), Couto *et al.*, Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994) y Pedersen *et al.*, J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994). Frecuentemente, los residuos de marco en las regiones marco se sustituirán con el correspondiente residuo del anticuerpo donante de CDR para alterar, por ejemplo, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de los residuos de marco y CDR para identificar los residuos de marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los residuos de marco inusuales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen *et al.*, patente estadounidense n.º 5.585.089; y Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332:323).

Un anticuerpo humanizado o fragmento de este tiene uno o más residuos de aminoácidos que permanecen en este de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente residuos de "importación", que se toman normalmente de un dominio variable de "importación". Tal como se proporciona en la presente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo humanizados comprenden una o más CDR de moléculas de

inmunoglobulina no humana y regiones marco donde los residuos de aminoácidos que comprenden el marco derivan de la línea germinal humana, completamente o en su mayor parte. Se conocen en la técnica múltiples técnicas para la humanización de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y se pueden llevar a cabo básicamente siguiendo el método de Winter y sus colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), mediante la sustitución con CDR de roedor o secuencias de CDR de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, injertos de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT n.º WO 91/09967; y las patentes estadounidenses n.º 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640). En tales anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo, se sustituyó considerablemente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son frecuentemente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de marco (FR, por sus siglas en inglés) se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La humanización de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo también se puede lograr mediante inactivación o remodelación de superficie (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 la trasposición de cadena (patente estadounidense n.º 5.565.332).

La elección de dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, que se va a usar en la creación de los anticuerpos humanizados es para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza comparándola con la biblioteca completa de secuencias humanas de dominio variable conocidas. La secuencia humana más próxima a la del roedor se acepta entonces como el marco (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 particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Es posible usar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (véase, por ejemplo, Nicholson *et al.* *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)). En algunas modalidades, la región marco, por ejemplo, las cuatro regiones marco, de la región variable de cadena pesada derivan de una secuencia de línea germinal VH4-4-59. En una modalidad, la región marco puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, del aminoácido en la secuencia murina correspondiente. En una modalidad, la región marco, por ejemplo, las cuatro regiones marco de la región variable de cadena ligera, deriva de una secuencia de línea germinal VK3-1.25. En una modalidad, la región marco puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, del aminoácido en la secuencia murina correspondiente.

En algunos aspectos, la parte de una composición de TFP de la invención que comprende un fragmento de anticuerpo se humaniza con la retención de alta afinidad para el antígeno objetivo y otras propiedades biológicas favorables. De acuerdo con un aspecto de la invención, los anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales mediante el uso de modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son conocidos para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras de conformación tridimensional probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, por ejemplo, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse al antígeno objetivo. De esta forma, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se logre la característica deseada de anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como el aumento de afinidad para el antígeno objetivo. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado puede retener una especificidad antigénica similar al anticuerpo original, por ejemplo, en la presente invención, la capacidad de unirse a mesotelina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado puede tener afinidad y/o especificidad mejoradas de unión a mesotelina humana.

En un aspecto, el dominio de unión a anti-mesotelina se caracteriza por rasgos o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en un aspecto, la parte de una composición de TFP de la invención que comprende un dominio de unión al antígeno se une específicamente a mesotelina humana. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno tiene la misma especificidad de unión, o similar, a mesotelina humana que el scFv FMC63 descrito en Nicholson *et al.* *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997). En un aspecto, la invención se relaciona con un dominio de unión al antígeno que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde el dominio de unión al anticuerpo se une específicamente a una proteína de mesotelina o un fragmento de esta, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos que se proporciona en la presente. En determinados aspectos, scFv es contiguo y se encuentra en el mismo marco de lectura que una secuencia líder.

En un aspecto, el dominio de unión a anti-mesotelina es un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena simple (scFv).

5 También se describen en la presente métodos para obtener un dominio de unión al antígeno del anticuerpo específico para un antígeno objetivo (por ejemplo, mesotelina o cualquier antígeno objetivo descrito en otras secciones de la presente para dianas de dominios de unión a restos de fusión), donde el método comprende proporcionar mediante adición, eliminación, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio V_H establecido en la presente, un dominio V_H que es una secuencia de aminoácidos variante del dominio V_H , que combina opcionalmente el dominio V_H que se proporciona con uno o más dominios V_L , y analizar el dominio V_H o la combinación V_H/V_L o combinaciones para identificar un miembro de unión específico o un dominio de unión al antígeno del anticuerpo específico para un antígeno objetivo de interés (por ejemplo, mesotelina) y opcionalmente con una o más propiedades deseadas.

10 Los dominios V_H y scFv se pueden preparar de acuerdo con el método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426 y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Las moléculas de scFv se pueden producir mediante enlaces de las regiones V_H y V_L entre sí mediante el uso de 15 enlazadores polipeptídicos flexibles. Las moléculas de scFv comprenden un enlazador (por ejemplo, un enlazador Ser-Gly) con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. La longitud de enlazador puede afectar 20 enormemente a cómo se pliegan e interactúan las regiones variables de un scFv. De hecho, si se emplea un enlazador polipeptídico corto (por ejemplo, entre 5-10 aminoácidos) se impide el pliegue dentro de la cadena. El pliegue dentro 25 de la cadena también es necesario para juntar las dos regiones variables para formar un sitio de unión al epítopo funcional. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora larga (LL). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga comprende $(G_4S)_n$, donde $n=2$ a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora corta (SL). En algunos casos, la secuencia enlazadora corta comprende $(G_4S)_n$, donde $n=1$ a 3. Para ejemplos de orientación y tamaños de enlazadores, véase, por ejemplo, Hollinger *et al.* 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448, patente estadounidense n.º 7.695.936, publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º 20050100543 y 20050175606, y publicación PCT n.º WO2006/020258 y WO2007/024715.

30 Un scFv puede comprender un enlazador de alrededor de 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más de 15 residuos entre sus regiones V_L y V_H . La secuencia enlazadora puede comprender cualquier aminoácido de origen natural. En algunas modalidades, la secuencia enlazadora comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra modalidad, la secuencia enlazadora comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina tales como $(Gly_4Ser)_n$, donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1. En una modalidad, el enlazador puede ser $(Gly_4Ser)_4$ o $(Gly_4Ser)_3$. La variación 35 en la longitud de enlazadora puede conservar o mejorar la actividad, lo que da lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad. En algunos casos, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora larga (LL). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga comprende $(G_4S)_n$, donde $n=2$ a 4. En algunos casos, la secuencia enlazadora corta comprende $(G_4S)_n$, donde $n=1$ a 3.

Estabilidad y mutaciones

40 La estabilidad de un dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, moléculas de scFv (por ejemplo, scFv soluble) se puede evaluar con referencia a las propiedades biofísicas (por ejemplo, la estabilidad térmica) de una molécula de scFv de control convencional o un anticuerpo de longitud total. En una modalidad, el scFv humanizado o humano tiene una estabilidad térmica que es mayor de alrededor de 0,1, alrededor de 0,25, alrededor de 0,5, alrededor de 0,75, alrededor de 1, alrededor de 1,25, alrededor de 1,5, alrededor de 1,75, alrededor de 2, alrededor de 2,5, alrededor de 45 3, alrededor de 3,5, alrededor de 4, alrededor de 4,5, alrededor de 5, alrededor de 5,5, alrededor de 6, alrededor de 6,5, alrededor de 7, alrededor de 7,5, alrededor de 8, alrededor de 8,5, alrededor de 9, alrededor de 9,5, alrededor de 10 grados, alrededor de 11 grados, alrededor de 12 grados, alrededor de 13 grados, alrededor de 14 grados o alrededor de 15 grados Celsius que un scFv original en los ensayos descritos.

50 La estabilidad térmica mejorada del dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, scFv se confiere posteriormente a la construcción total de mesotelina-TFP, lo que conduce a propiedades terapéuticas mejoradas de la construcción de TFP anti-mesotelina. La estabilidad térmica del dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, scFv se puede mejorar en al menos alrededor de 2 °C o 3 °C en comparación con un anticuerpo convencional. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, scFv tiene una estabilidad térmica mejorada de 1 °C en comparación 55 con un anticuerpo convencional. En otra modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, scFv tiene una estabilidad térmica mejorada de 2 °C en comparación con un anticuerpo convencional. En otra modalidad, el scFv tiene una estabilidad térmica mejorada de 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C o 15 °C en comparación con un anticuerpo convencional. Las comparaciones se pueden realizar, por ejemplo, entre moléculas de scFv descritas en la presente y moléculas de scFv o fragmentos de Fab de un anticuerpo del cual derivan scFv V_H y V_L . Es posible medir la estabilidad térmica mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad, se puede medir T_M . Los métodos para medir T_M y otros métodos para la determinación de la estabilidad de las proteínas se describen más adelante.

60 65 Las mutaciones en scFv (que surgen mediante la humanización o la mutagénesis del scFv soluble) alteran la estabilidad del scFv y mejoran la estabilidad general del scFv y la construcción TFP anti-mesotelina. La estabilidad del scFv humanizado se compara con el scFv murino mediante el uso de mediciones tales como T_M , desnaturización de

temperatura y concentración de temperatura. En una modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, un scFv, comprende al menos una mutación que surge del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere estabilidad mejorada a la construcción de TFP anti-mesotelina. En otra modalidad, el dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, scFv comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surgen del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere estabilidad mejorada a la construcción de mesotelina-TPP.

5

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno de la TFP comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de dominio de unión al antígeno descrita en la presente, y el dominio de unión al antígeno conserva las propiedades funcionales deseadas de los fragmentos de anticuerpo anti-mesotelina descritos en la presente. En un aspecto específico, la composición de TFP de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, ese fragmento de anticuerpo comprende un scFv.

10 En diversos aspectos, el dominio de unión al antígeno de la TFP se modifica mediante la modificación de uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (por ejemplo, V_H y/o V_L), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. En un aspecto específico, la composición de TFP de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, ese fragmento de anticuerpo comprende un scFv.

15

20 El experto en la técnica comprenderá que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención puede modificarse adicionalmente de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, de tipo salvaje), pero no en la actividad deseada. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos adicionales que conducen a las sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" pueden realizarse en la proteína. Por ejemplo, un residuo de aminoácidos no esencial en una molécula se puede remplazar con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra modalidad, una serie de aminoácidos se puede remplazar con una serie estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadena lateral, por ejemplo, es posible realizar una sustitución conservadora, en la cual se remplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar.

25

30 Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

35

35

El porcentaje de identidad en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si poseen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, 60 % de identidad, opcionalmente 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad en una región específica, o, cuando no se especifica, en la totalidad de la secuencia), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada, tal como se mide mediante el uso de uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. De manera opcional, la identidad existe en una región que tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos), o más preferentemente en una región que tiene una longitud de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos).

40

40

Para comparar las secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos. Pueden usarse los parámetros de programa predeterminados o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias después calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, con base en los parámetros de programa. Se conocen en la técnica los métodos para alinear las secuencias para su comparación. La alineación óptima de secuencias para su comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman, (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin

45

45

Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis), o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Brent *et al.*, (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*). Dos ejemplos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; y Altschul *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El software para la realización del análisis con BLAST se encuentra disponible

50

50

50

públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

En un aspecto, la presente invención contempla las modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de inicio (por ejemplo, scFv) que genera moléculas equivalentes en cuanto a su función. Por ejemplo, V_H o V_L de un dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, scFv, que comprende la TFP se pueden modificar para conservar al menos alrededor de 70 %, 71 %, 72%, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %,

5 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de la región marco V_H o V_L de inicio del dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, scFv. La presente invención contempla modificaciones de la construcción total de TFP, por ejemplo, las modificaciones en una o más secuencias de aminoácidos de los diversos dominios de la construcción TFP para generar moléculas equivalentes en cuanto a función. La construcción TFP se puede modificar para conservar al menos alrededor de 70 %, 71 %, 72%, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de la construcción TFP de inicio.

Dominio extracelular

15 El dominio extracelular se puede derivar ya sea de una fuente natural o recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína, pero en particular una proteína transmembrana o unida a la membrana. En un aspecto, el dominio extracelular es capaz de asociarse con el dominio transmembrana.

Dominio transmembrana

20 En general, una secuencia TFP contiene un dominio extracelular y un dominio transmembrana codificado por una secuencia genómica simple. En modalidades alternativas, una TFP se puede diseñar para que comprenda un dominio transmembrana que es heterólogo respecto al dominio extracelular de la TFP. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales junto a la región transmembrana, por ejemplo, uno o más aminoácidos 25 asociados con la región extracelular de la proteína de la cual deriva la transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la cual deriva la proteína transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es aquel que se asocia 30 con uno de los otros dominios de la TFP usada. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie, por ejemplo, para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de homodimerización con otra TFP en la superficie de TFP-linfocito T. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana se puede modificar o sustituir de modo que se minimicen las interacciones con los dominios de unión 35 del compañero de unión natural presente en la misma TFP.

El dominio transmembrana se puede derivar ya sea de una fuente natural o recombinante. Cuando la fuente sea natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o proteína transmembrana. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de señalizar los dominios intracelulares cuando la TFP se ha unido a un 40 objetivo.

En algunos casos, el dominio transmembrana puede unirse a la región extracelular de la TFP, por ejemplo, el dominio de unión al antígeno de la TFP, mediante una bisagra, por ejemplo, una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una modalidad, la bisagra puede ser una bisagra de inmunoglobulina humana (Ig), por ejemplo, una bisagra IgG4 45 o una bisagra CD8a.

Enlazadores

50 Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática de la TFP. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 53). En algunas modalidades, el enlazador se codifica mediante una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 54).

Dominio citoplasmático

55 El dominio citoplasmático de la TFP puede incluir un dominio de señalización intracelular, si la TFP contiene los polipéptidos CD3 gamma, delta o épsilon; las subunidades TCR alfa y TCR beta generalmente carecen de un dominio de señalización. Generalmente, un dominio de señalización intracelular es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la cual se introdujo la TFP. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad auxiliar, inclusive la secreción de citocinas. Por lo tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige la célula para realizar una función especializada. Si bien generalmente se puede emplear la totalidad del dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se utilice una parte truncada del dominio de señalización intracelular, dicha parte truncada se puede usar en lugar de la cadena

intacta mientras transduzca la señal de función efectora. La expresión dominio de señalización intracelular, por lo tanto, pretende incluir cualquier parte truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

- 5 Los ejemplos de dominios de señalización intracelular para su uso en la TFP de la invención incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (TCR) y los correceptores que actúan en conjunto para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia recombinante que tenga la misma capacidad funcional.
- 10 Se sabe que las señales generadas únicamente a través de TCR no son suficientes para la activación total de los linfocitos T sin tratamiento previo y que se necesita una señal secundaria y/o coestimuladora. Por tanto, se puede decir que la activación de linfocitos T sin tratamiento previo se encuentra mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: aquellas que inician la activación primaria dependiente del antígeno mediante TCR (dominios de señalización intracelular primarios) y aquellas que actúan de una manera independiente de 15 el antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (dominio citoplasmático secundario, por ejemplo, un dominio coestimulador).

Un dominio de señalización primario regula la activación primaria del complejo TCR, ya sea de una manera estimuladora o de una manera inhibidora. Los dominios de señalización intracelular primarios que actúan de una manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM).

20 Los ejemplos de ITAM que contienen dominios de señalización intracelular primarios que son de uso particular en la invención incluyen aquellos de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una modalidad, una TFP de la invención comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización primario de CD3-épsilon. En una modalidad, un dominio de señalización primario comprende un dominio ITAM modificado, por ejemplo, un dominio ITAM mutado que tiene una alteración (por ejemplo, un aumento o una disminución) de la actividad, en comparación con el dominio ITAM natural. En una modalidad, un dominio de señalización primario comprende un dominio de señalización intracelular primario 25 que contiene ITAM modificado, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM optimizado y/o truncado. En una modalidad, un dominio de señalización primario comprende uno, dos, tres, cuatro o más motivos ITAM.

30 El dominio de señalización intracelular de la TFP puede comprender una parte de cadena CD3 épsilon y un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una parte de la TFP que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta a un receptor de antígeno o sus ligandos, que se necesita para una respuesta eficiente de linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, DAP10, DAP12, CD30, CD40, PD1, ICOS, el antígeno 1 asociado con la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, 35 NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. Por ejemplo, la coestimulación con CD27 ha demostrado que mejora la expansión, la función efectora y la supervivencia de los linfocitos T TFP humanos *in vitro* y aumenta la continuidad de los linfocitos T humanos y la actividad antitumoral *in vivo* (Song *et al.* Blood. 2012; 119(3):696-706).

40 45 Las secuencias de señalización intracelular dentro de la parte citoplasmática de la TFP de la invención se pueden enlazar entre sí en un orden específico o aleatorio. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, por ejemplo, entre 2 y 10 aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) de longitud, puede formar el enlace entre las secuencias de señalización intracelular.

50 En una modalidad, es posible usar un doblete de glicina-serina como enlazador adecuado. En una modalidad, es posible usar un aminoácido simple, por ejemplo, una alanina, una glicina, como enlazador adecuado.

55 En un aspecto, la célula que expresa TFP descrita en la presente puede comprender además una segunda TFP, por ejemplo, una segunda TFP que incluye un dominio de unión al antígeno diferente, por ejemplo, al mismo objetivo (mesotelina) o a un objetivo diferente (por ejemplo, CD123). En una modalidad, cuando la célula que expresa TFP comprende dos o más TFP diferentes, los dominios de unión al antígeno de las diferentes TFP pueden ser tales que los dominios de unión al antígeno no interactúen entre sí. Por ejemplo, una célula que expresa una primera y una segunda TFP puede tener un dominio de unión al antígeno de la primera TFP, por ejemplo, como un fragmento, por ejemplo, un scFv, que no se asocia con el dominio de unión al antígeno de la segunda TFP, por ejemplo, el dominio de unión al antígeno de la segunda TFP es un V_{HH}.

60 65 En otro aspecto, la célula que expresa TFP descrita en la presente puede expresar además otro agente, por ejemplo, un agente que mejore la actividad de una célula que exprese TFP. Por ejemplo, en una modalidad, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, por ejemplo, PD1, pueden disminuir, en algunas modalidades, la capacidad de una célula que expresa TFP de generar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1,

CD160, 2B4 y TGFR beta. En una modalidad, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociada con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en la presente. En una modalidad, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora tal como PD1, LAG3, CTLA4,

5 CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 y TIGIT, o un fragmento de cualquiera de estos (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en la presente (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 4-1BB, CD27 o CD28, por ejemplo, tal como se describe en la presente) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en la presente). En una modalidad, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento de este (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en la presente (por ejemplo, un dominio de señalización CD28 descrito en la presente y/o un dominio de señalización CD3 zeta descrito en la presente). PD1 es un miembro inhibidor de la familia CD28 de los receptores que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en los linfocitos B, linfocitos T y células mieloídes activados (Agata *et al.* 1996 *Int. Immunol.* 8:765-75). Se ha demostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 regulan por disminución la activación de los linfocitos T tras la unión a PD1 (Freeman *et al.* 2000 *J Exp Med.* 192:1027-34; Latchman *et al.* 2001 *Nat Immunol.* 2:261-8; Carter *et al.* 2002 *Eur J Immunol.* 32:634-43). PD-L1 es abundante en los cánceres humanos (Dong *et al.* 2003 *J Mol Med.* 81:281-7; Blank *et al.* 2005 *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi *et al.* 2004 *Clin Cancer Res.* 10:5094). La supresión inmunitaria se puede revertir mediante inhibición de la interacción local de PD1 con PD-L1.

10 20 En una modalidad, el agente comprende el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de una molécula inhibidora, por ejemplo, es posible fusionar muerte programada 1 (PD1) a un dominio transmembrana y opcionalmente un dominio de señalización intracelular tal como 41BB y CD3 zeta (a los que también se hace referencia como PD1 TFP). En una modalidad, la PD1 TFP, cuando se usa combinada con una TFP anti-mesotelina descrita en la presente, mejora la continuidad de los linfocitos T. En una modalidad, la TFP es una PD1 TFP que comprende el dominio extracelular de PD 1. De manera alternativa, se proporcionan TFP que contienen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tal como un scFv que se une específicamente al ligando de muerte programada 1 (PD-L1) o el ligando de muerte programada 2 (PD-L2).

15 25 30 35 40 45 50 55 60 65 En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de linfocitos T que expresan TFP, por ejemplo, linfocitos T-TFP. En algunas modalidades, la población de linfocitos T que expresan TFP comprende una mezcla de células que expresan diferentes TFP. Por ejemplo, en una modalidad, la población de linfocitos T TFP puede incluir una primera célula que expresa una TFP que tiene un dominio de unión a anti-mesotelina descrito en la presente y una segunda célula que expresa una TFP que tiene un dominio de unión a anti-mesotelina diferente, por ejemplo, un dominio de unión a anti-mesotelina descrito en la presente que difiere del dominio de unión a anti-mesotelina en la TFP expresada por la primera célula. A modo de otro ejemplo, la población de células que expresan TFP puede incluir una primera célula que expresa una TFP que incluye un dominio de unión a anti-mesotelina, por ejemplo, tal como se describe en la presente, y una segunda célula que expresa una TFP que incluye un dominio de unión al antígeno a un objetivo que no sea mesotelina (por ejemplo, otro antígeno asociado con el tumor).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de células donde al menos una célula en la población expresa una TFP que tiene un dominio anti-mesotelina descrito en la presente, y una segunda célula que expresa otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa TFP. Por ejemplo, en una modalidad, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras pueden, por ejemplo, en algunas modalidades, disminuir la capacidad de una célula que expresa TFP de generar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En una modalidad, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociada con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en la presente.

En la presente se describen métodos para la producción de ARN transcripto *in vitro* que codifica TFP. La presente invención también incluye una construcción de ARN que codifica TFP que se puede transfectar directamente a una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección puede implicar la transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguido por la adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida en 3' y 5' ("UTR"), un casquete en 5' y/o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés), el ácido nucleico a expresar y una cola poliA, normalmente con una longitud de 50-2000 bases. El ARN producido de este modo puede transfectar de forma eficiente diferentes tipos de células. En un aspecto, la plantilla incluye secuencias para la TFP.

En un aspecto, la TFP anti-mesotelina se codifica mediante ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica la TFP anti-mesotelina se introduce en un linfocito T para la producción de un linfocito T-TFP. En una modalidad, la TFP con ARN transcripto *in vitro* se puede introducir en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce mediante transcripción *in vitro* mediante el uso de una plantilla generada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Es posible convertir directamente el ADN de interés de cualquier fuente mediante PCR en una plantilla para la síntesis *in vitro* del ARNm mediante el uso de cebadores adecuados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN de plásmidos, ADN

de fago, ADNc, una secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente adecuada de ADN. La plantilla deseada para la transcripción *in vitro* es una TFP de la presente invención. En una modalidad, el ADN a usar para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN de origen natural del genoma de un organismo. En una modalidad, el ácido nucleico puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas 5' y/o 3' (UTR). El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. En una modalidad, el ADN a usar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humana. En otra modalidad, el ADN a usar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humana que incluye las UTR 5' y 3'. El ADN puede ser, de forma alternativa, una secuencia de ADN artificial que no se expresa normalmente en un organismo de origen natural. Un ejemplo de secuencia de ADN artificial es aquel que contiene partes de genes que se ligan entre sí para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las partes de ADN que se ligan entre sí pueden ser de un único organismo o de más de un organismo.

La PCR se usa para generar una plantilla para la transcripción *in vitro* del ARNm que se usa para la transfección. Los métodos para llevar a cabo la PCR son conocidos en la técnica. Se diseñan cebadores para su uso en la PCR para que tengan regiones que son considerablemente complementarias respecto a regiones del ADN que se van a usar como plantilla para la PCR. "Considerablemente complementario/a", tal como se usa en la presente, se refiere a secuencias de nucleótidos donde la mayoría o todas las bases en la secuencia cebadora son complementarias, o una o más bases no son complementarias o tienen error de emparejamiento. Las secuencias considerablemente complementarias son capaces de hibridarse con el ADN objetivo pretendido en condiciones de hibridación usadas para PCR. Los cebadores pueden diseñarse para ser considerablemente complementarios respecto a cualquier parte de la plantilla de ADN. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar para amplificar la parte de un ácido nucleico que normalmente se transcribe en células (el marco de lectura abierto), inclusive las UTR 5' y 3'. Los cebadores también pueden diseñarse para amplificar una parte de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. En una modalidad, los cebadores se diseñan para amplificar la región codificante de un ADNc humano, inclusive todas o partes de las UTR 5' y 3'. Los cebadores útiles para la PCR se pueden generar mediante métodos sintéticos que son conocidos en la técnica. "Cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son considerablemente complementarios respecto a los nucleótidos en la plantilla de ADN que se encuentran en la parte anterior de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Parte anterior" se usa en la presente para hacer referencia a una ubicación 5', respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena codificante. "Cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son considerablemente complementarios respecto a una plantilla de ADN de cadena doble que se encuentra en la parte posterior de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Parte posterior" se usa en la presente para hacer referencia a una ubicación 3', respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar en relación con la cadena codificante.

35 Es posible usar cualquier ADN polimerasa útil para la PCR en los métodos descritos en la presente. Los reactivos y la polimerasa se encuentran disponibles en el mercado de varias fuentes.

También se pueden usar estructuras químicas con capacidad de promover la eficiencia de estabilidad y/o traducción. El ARN tiene preferentemente UTR 5' y 3'. En una modalidad, la UTR 5' se encuentra entre uno y 3000 nucleótidos de longitud. La longitud de las secuencias de UTR 5' y 3' que se van a agregar a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, inclusive, de modo no taxativo, el diseño de cebadores para PCR que se hibriden a diferentes regiones de las UTR. Mediante el uso de este enfoque, el experto en la técnica puede modificar las longitudes de las UTR 5' y 3' necesarias para lograr la eficiencia de traducción óptima después de la transfección del ARN transrito.

45 Las UTR 5' y 3' pueden ser UTR 5' y 3' endógenas de origen natural para el ácido nucleico de interés. De manera alternativa, las secuencias de UTR que no son endógenas respecto al ácido nucleico de interés se pueden agregar mediante la incorporación de las secuencias de UTR en los cebadores directos e inversos o mediante cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de las secuencias de UTR que no son endógenas respecto al ácido nucleico de interés puede ser útil para la modificación de la eficiencia de estabilidad y/o traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en las secuencias de UTR 3' pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las UTR 3' se pueden seleccionar o diseñar para aumentar la estabilidad del ARN transrito según las propiedades de las UTR que se conocen en la técnica.

55 En una modalidad, la UTR 5' puede contener la secuencia Kozak del ácido nucleico endógeno. De manera alternativa, cuando una UTR 5' que no es endógena respecto al ácido nucleico de interés se agrega por PCR tal como se describió anteriormente, es posible rediseñar una secuencia de consenso Kozak mediante la adición de la secuencia de UTR 5'. Las secuencias Kozak pueden aumentar la eficiencia de traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficiente. El requisito para las secuencias Kozak para muchos ARN se conoce en la técnica. En otras modalidades, la UTR 5' puede ser la UTR 5' de un virus de ARN cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras modalidades, es posible usar diversos análogos de nucleótidos en la UTR 3' o 5' para impedir la degradación de exonucleasa del ARNm.

65 Para permitir la síntesis del ARN a partir de una plantilla de ADN sin necesidad de clonación genética, debe unirse un promotor de transcripción a la plantilla de ADN en la parte anterior de la secuencia que se va a transcribir. Cuando una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa se agrega al extremo 5' del cebador directo,

el promotor de la ARN polimerasa se incorpora en el producto de PCR en la parte anterior del marco de lectura abierto que se va a transcribir. En una modalidad preferida, el promotor es un promotor de T7 polimerasa, tal como se describe en otras secciones de la presente. Otros promotores útiles incluyen, de modo no taxativo, los promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de nucleótidos de consenso para los promotores T7, T3 y SP6 son conocidas en la técnica.

5 En una modalidad preferida, el ARNm tiene tanto un casquete en el extremo 5' como una cola poli(A) en 3' que determinan la unión al ribosoma, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En una plantilla de ADN circular, por ejemplo, el ADN de plásmido, la ARN polimerasa produce un producto concatamérico largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN de plásmido linealizado en el extremo de UTR 3' produce un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota, incluso si se poliadeniliza después de la transcripción.

10 15 En una plantilla de ADN lineal, la ARN polimerasa de fago T7 puede extender el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base de la plantilla (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003).

20 25 El método convencional de integración de extensiones poliA/T en una plantilla de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN de plásmido puede causar inestabilidad del plásmido, por lo cual las plantillas de ADN de plásmido obtenidas de células bacterianas frecuentemente se encuentran muy contaminadas con eliminaciones y otras irregularidades. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean trabajosos y que requieran mucho tiempo, sino que frecuentemente no son fiables. Por este motivo es muy deseable un método que permita la construcción de plantillas de ADN con extensiones poliA/T en 3' sin clonación.

30 35 40 45 50 55 60 El segmento poliA/T de la plantilla de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un cebador inverso que contiene una cola poliT, tal como una cola de 100 T (el tamaño puede ser de 50-5000 T), o después de la PCR mediante cualquier otro método, inclusive, de modo no taxativo, ligadura de ADN o recombinación *in vitro*. Las colas poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Por lo general, la longitud de una cola poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrita. En una modalidad, la cola poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas.

Las colas poli(A) de ARN se pueden extender adicionalmente después de la transcripción *in vitro* con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como una poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP, por sus siglas en inglés). En una modalidad, el aumento de la longitud de una cola poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos produce alrededor de un aumento de dos veces la eficacia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Tal unión puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP pueden incorporarse en la cola poli(A) mediante el uso de poli(A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar además la estabilidad del ARN.

40 45 50 55 60 Los casquitos en 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una modalidad preferida, los ARN producidos por los métodos descritos en la presente incluyen un casquete 5'. El casquete en 5' se proporciona mediante el uso de métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente (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 métodos descritos en la presente también contienen una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). La secuencia de IRES puede ser cualquier secuencia vírica, cromosómica o de diseño artificial que inicie la unión del ribosoma independiente del casquete al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Es posible incluir cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que puede contener factores que facilitan la permeabilidad y viabilidad celular, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

Es posible introducir el ARN en células objetivo mediante el uso de cualquier cantidad de métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles en el mercado que incluyen, de modo no taxativo, electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), transfección mediada por liposoma catiónico mediante el uso de lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos o sistemas de administración de partículas biológicas tales como "pistolas génicas" (véase, por ejemplo, Nishikawa, *et al.* Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)).

60 **Construcciones de ácido nucleico que codifican una TFP**

La presente invención proporciona también moléculas de ácido nucleico que codifican una o más construcciones de TFP descritas en las reivindicaciones. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una transcripción de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una construcción de ADN.

- Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener mediante el uso de métodos recombinantes conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante el análisis de bibliotecas de células que expresan el gen, mediante la derivación del gen a partir de un vector que se sabe que las incluye o mediante el aislamiento directamente de las células y tejidos que las contienen, mediante el uso de técnicas estándar. De manera alternativa, el gen de interés se puede producir por medios sintéticos, en lugar de clonarse.
- 5 La presente invención proporciona también vectores en los cuales se inserta un ADN de la presente invención. Los vectores derivados de retrovirus, tales como lentivirus, son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo ya que permiten una integración estable y duradera de un transgén y su propagación en las células hijas.
- 10 Los vectores lentivirales tienen la ventaja agregada sobre los vectores derivados de onco-retrovirus, tal como virus de leucemia murina, de que pueden transducir células no proliferativas, tales como hepatocitos. También tienen la ventaja agregada de tener baja inmunogenicidad.
- 15 En otra modalidad, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica la TFP deseada de la invención es un vector adenoviral (A5/35). En otra modalidad, la expresión de ácidos nucleicos que codifican las TFP se puede lograr mediante el uso de transposones tales como bella durmiente, crisper, CAS9 y nucleasas de dedos de zinc (véase, June *et al.* 2009 *Nature Reviews Immunol.* 9.10: 704-716).
- 20 Las construcciones de expresión de la presente invención también se pueden usar para la inmunización con ácido nucleico y la terapia génica, mediante el uso de protocolos de administración génica estándares. Los métodos para la administración génica son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466). En otra modalidad, la invención proporciona un vector de terapia génica.
- 25 El ácido nucleico se puede clonar en una cantidad de tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, de modo no taxativo, un plásmido, un fagémido, un derivado de fagos, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sonda y vectores secuenciadores.
- 30 Además, el vector de expresión se puede proporcionar en una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tomos 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), y otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, de modo no taxativo, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios convenientes de endonucleasa de restricción y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente estadounidense n.º 6.326.193).
- 35 Se ha desarrollado una cantidad de sistemas virales para la transferencia génica en células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para sistemas de administración de genes. Se puede insertar un gen seleccionado en un vector e insertarse en partículas retrovirales mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Después es posible aislar el virus recombinante y administrarlo a las células del sujeto ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Se conoce en la técnica una cantidad de sistemas retrovirales. En algunas modalidades, se usan los vectores de adenovirus. Se conoce en la técnica una cantidad de vectores de adenovirus. En una modalidad, se usan vectores de lentivirus.
- 40 45 Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de inicio de la transcripción. Comúnmente, estos se encuentran ubicados en la región 30-110 pb en la parte anterior del sitio de inicio, si bien se ha demostrado que una cantidad de promotores contiene elementos funcionales en la parte posterior del sitio de inicio. El espacio entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de manera que se conserve la función del promotor cuando los elementos se invierten o mueven unos con respecto a los otros. En el promotor de timidina cinasa (tk, por sus siglas en inglés), el espacio entre los elementos promotores puede aumentar a 50 pb de separación antes de que comience a decaer la actividad. Según el promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar ya sea de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción.
- 50 55 Un ejemplo de un promotor que es capaz de expresar un transgén TFP en un linfocito T de mamífero es el promotor EF1a. El promotor natural EF1a conduce la expresión de la subunidad alfa del complejo de factor de elongación 1, que es responsable de la administración enzimática de los aminoacil ARNt al ribosoma. El promotor EF1a se ha usado ampliamente en plásmidos de expresión en mamíferos y ha demostrado ser eficaz en la conducción de la expresión de TFP a partir de transgenes clonados en un vector lentiviral (véase, por ejemplo, Milone *et al.*, *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009)). Otro ejemplo de promotor es la secuencia promotora de citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés) temprana inmediata. Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte que puede impulsar niveles altos de expresión de cualquier secuencia de polinucleótidos unida operativamente a esta. Sin embargo, también es posible usar otras secuencias promotoras constitutivas, inclusive, de modo no taxativo, el promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), el virus tumoral mamario de ratones (MMTV, por sus siglas en inglés), el promotor de la repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor del virus de leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus de sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, de

- modo no taxativo, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor del factor de elongación 1a , el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. También se contemplan los promotores inducibles como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un cambio molecular capaz de encender la expresión de la secuencia de polinucleótidos que se enlaza de forma operativa cuando se desea tal expresión, o apagar la expresión cuando no se desea tal expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, de modo no taxativo, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoide, un promotor de progesterona y un promotor regulador por tetraciclina.
- 5 Para evaluar la expresión de un polipéptido de TFP o partes de este, el vector de expresión que se introducirá en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de las células que presentan expresión a partir de la población de células que se pretende transfectar o infectar a través de los vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable se puede llevar en una parte de ADN separada y usarse en un procedimiento de transfección conjunta. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores se pueden flanquear con secuencias reguladoras apropiadas para permitir 10 la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores seleccionables incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.
- 15 Los genes indicadores se usan para identificar las células posiblemente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no se encuentra presente en o expresado 20 por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta mediante alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. Se evalúa la expresión del gen indicador en un momento adecuado después de la introducción del ADN en las células receptoras. Los genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de proteína fluorescente verde (por ejemplo, *Ui-Tei et al.*, 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los 25 sistemas de expresión adecuados son conocidos y se pueden preparar mediante el uso de técnicas conocidas u obtenerse en el mercado. En general, la construcción con la región flanqueante mínima en 5' que muestra el mayor nivel de expresión de gen indicador se identifica como promotor. Dichas regiones promotoras pueden unirse a un gen indicador y usarse para evaluar los agentes y determinar la capacidad de modular la transcripción impulsada por el promotor.
- 30 Los métodos para introducir y expresar genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector se puede introducir fácilmente en una célula hospedadora, por ejemplo, célula de mamífero, bacteria, levadura o insecto mediante cualquier método de la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula hospedadora por medios físicos, químicos o biológicos.
- 35 Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir 40 células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Sambrook et al.*, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tomos 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Un método para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio
- 45 Los métodos biológicos para la introducción de un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más usado para insertar genes en células de mamífero, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivar de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados y similares (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5.350.674 y 5.585.362).
- 50 Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen los sistemas de dispersión coloidal, como los complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un ejemplo de sistema coloidal para 55 usarse como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial). Se encuentran disponibles otros métodos de administración dirigida de ácidos nucleicos de última generación, tal como la administración de polinucleótidos con nanopartículas dirigidas u otro sistema de administración de tamaño submicrónico adecuado.
- 60 En caso de que se utilice un sistema de administración no viral, un ejemplo de vehículo de administración es un liposoma. El uso de las formulaciones lipídicas se contempla para la introducción de ácidos nucleicos en una célula hospedadora (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado a un lípido. El ácido nucleico asociado a un lípido puede encontrarse encapsulado en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro 65 de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma mediante una molécula de unión asociada al liposoma y al oligonucleótido, atrapado en un liposoma, formando un complejo con un liposoma, disperso en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o formando un complejo con una micela o asociado de otro modo a un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípido/ADN o lípido/vector de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en la solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de bicapa, como micelas o con una estructura "contraída". También pueden encontrarse simplemente intercaladas en una solución, posiblemente formando agregados que no presenten

un tamaño o forma uniforme. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos sintéticos o de origen natural. Por ejemplo, los lípidos incluyen las microgotas grasas que se originan naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, como los ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

5 Los lípidos adecuados para usarse se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, fosfatidilcolina de dimiristilo ("DMPC") se puede obtener de Sigma, St. Louis, Mo.; fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, N.Y.); colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; fosfatidilglicerol de dimiristilo ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc., (Birmingham, Ala.). Las soluciones 10 madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a alrededor de -20 °C. El cloroformo se usa como único disolvente ya que se evapora más rápido que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una diversidad de vehículos lipídicos simples y multilamelares formados mediante la generación de bicapas lipídicas cerradas o agregados. Los liposomas pueden caracterizarse por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípido y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas 15 de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman de manera espontánea cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos sufren una autorreorganización antes de la formación de estructuras cerradas y retienen agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh *et al.*, 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Sin embargo, las composiciones que tienen diferentes estructuras en la solución que la estructura vesicular normal también se encuentran comprendidas. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o existir 20 meramente como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos de lipofectamina y ácido nucleico.

Independientemente del método usado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o exponer de otro modo una célula al inhibidor de la presente invención, para confirmar la presencia de la secuencia de 25 ADN recombinante en la célula hospedadora, es posible llevar a cabo una variedad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular" conocidos para los expertos en la técnica, tales como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o mediante ensayos descritos en la presente para identificar agentes que se encuentren dentro del alcance de la 30 invención.

La presente invención proporciona además un vector que comprende una TFP que codifica moléculas de ácido nucleico. En un aspecto, un vector TFP puede transducirse directamente en una célula, por ejemplo, un linfocito T. En un aspecto, el vector es un vector de clonación o de expresión, por ejemplo, un vector que incluye, de modo no taxativo, 35 una o más construcciones de vectores de plásmidos (por ejemplo, plásmidos de expresión, vectores de clonación, minicírculos, minivectores, cromosomas dobles diminutos), retrovirales y lentivirales. En un aspecto, el vector es capaz de expresar la construcción de TFP en linfocitos T de mamífero. En un aspecto, el linfocito T de mamífero es un linfocito T humano.

40 Fuentes de linfocitos T

Antes de la expansión y la modificación genética, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los cuales se pueda provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos). Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas 45 de estos. Los linfocitos T se pueden obtener de una cantidad de fuentes, inclusive células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En determinados aspectos de la presente invención, es posible usar cualquier cantidad de líneas de linfocitos T disponible en la técnica. En determinados aspectos de la 50 presente invención, es posible obtener linfocitos T de una unidad de sangre recolectada de un sujeto mediante el uso de cualquier cantidad de métodos conocidos para el experto en la técnica, tal como la separación Ficoll™. En un aspecto preferido, se obtienen las células de sangre en circulación de un individuo mediante aféresis. El producto de la aféresis normalmente contiene linfocitos, incluidos linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células extraídas mediante aféresis se pueden lavar para retirar la fracción de plasma y para colocar las células en un amortiguador o medio adecuado para las etapas de 55 procesamiento posteriores. En un aspecto de la invención, se lavan las células con solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). En un aspecto alternativo, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos cationes divalentes, si no todos. Las etapas de activación iniciales cuando no hay calcio pueden conducir a una activación incrementada. Tal como comprenderán fácilmente los expertos en la técnica, es posible lograr una etapa de lavado mediante métodos conocidos en la técnica, tal como mediante el uso de una centrifuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, el CytoMate de Baxter o el Cell Saver 5 de Haemonetics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, es posible volver a suspender las células en una diversidad de amortiguadores biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca y sin Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin amortiguador. De manera alternativa, los componentes no deseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y es posible volver a suspender las células 60 directamente en un medio de cultivo.

- En un aspecto, se pueden aislar linfocitos T de linfocitos de sangre periférica mediante lisado de los glóbulos rojos y eliminación de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga a contraflujo. Es posible aislar adicionalmente una subpoblación específica de linfocitos T, tal como linfocitos T CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+, mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en un aspecto, se aíslan los linfocitos T mediante incubación con microesferas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, 3x28), tal como DYNABEADS™ M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T deseados. En un aspecto, el período de tiempo es de alrededor de 30 minutos. En un aspecto adicional, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores de números enteros entre estos. En un aspecto adicional, el período de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En aun otro aspecto preferido, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En un aspecto, el período de tiempo de incubación es de 24 horas. Es posible usar tiempos de incubación más prolongados para aislar los linfocitos T en cualquier situación en la que haya pocos linfocitos T en comparación con otros tipos celulares, tal como al aislar linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, por sus siglas en inglés) de tejido tumoral o de individuos inmunodeprimidos. Además, el uso de tiempos de incubación más prolongados puede aumentar la eficiencia de la captura de linfocitos T CD8+. Por tanto, al acortar o alargar simplemente el tiempo, se permite que los linfocitos T se unan a las microesferas CD3/CD28 y/o al aumentar o disminuir la proporción de microesferas respecto a los linfocitos T (tal como se describe adicionalmente en la presente), es posible seleccionar de forma preferente subpoblaciones de linfocitos T a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros momentos durante el proceso. Adicionalmente, al aumentar o disminuir la proporción de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las microesferas u otra superficie, es posible seleccionar de forma preferencial subpoblaciones de linfocitos T a favor o en contra en el inicio del cultivo o en cualquier otro momento deseado. El experto en la técnica reconocería que también es posible usar múltiples ciclos de selección en el contexto de la presente invención. En determinados aspectos, puede resultar deseable llevar a cabo un procedimiento de selección y usar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden someterse a ciclos adicionales de selección.
- Es posible lograr el enriquecimiento de una población de linfocitos T mediante selección negativa con una combinación de anticuerpos dirigidos a los marcadores superficiales exclusiva para las células con selección negativa. Un método es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a los marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas de forma negativa. Por ejemplo, para el enriquecimiento de linfocitos CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En determinados aspectos, puede resultar deseable enriquecer o preferir de forma positiva linfocitos T reguladores que normalmente expresen CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ y FoxP3+. De manera alternativa, en determinados aspectos, los linfocitos T reguladores se reducen mediante microesferas conjugadas anti-C25 u otro método similar de selección.
- En una modalidad, es posible seleccionar una población de linfocitos T que exprese uno o más de IFN-γ, TNF-alfa, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina, u otras moléculas adecuadas, por ejemplo, otras citocinas. Los métodos de análisis para la expresión celular se pueden determinar, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la publicación PCT n.º: WO 2013/126712.
- Para aislar una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, es posible variar la concentración de células y superficie (por ejemplo, partículas tales como microesferas). En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el cual se mezclan las microesferas y las células (por ejemplo, aumento de la concentración de células), para asegurar el contacto máximo de células y microesferas. Por ejemplo, en un aspecto, se usa una concentración de 2 mil millones de células/ml. En un aspecto, se usa una concentración de mil millones de células/ml. En un aspecto adicional, se usan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En aun otro aspecto, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, es posible usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones elevadas puede producir un aumento en el rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente los antígenos objetivo de interés, tal como linfocitos T negativos para CD28, o de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (por ejemplo, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión más débil de CD28.
- En un aspecto relacionado, puede ser deseable usar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de linfocitos T y la superficie (por ejemplo, partículas tales como microesferas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona las células que expresan grandes cantidades de antígenos deseados que se van a unir a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ expresan niveles mayores de CD28 y se capturan de forma más eficiente que los linfocitos T CD8+ en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células usada es 5×10^6 /ml. En otros aspectos, la concentración usada puede ser de entre 1×10^5 /ml y 1×10^6 /ml y cualquier valor entero entre estos. En otros aspectos, las células pueden incubarse en un rotador durante extensiones de tiempo variables a velocidades variables a 2-10 °C o a temperatura ambiente.

También es posible congelar los linfocitos T para estimulación después de la etapa de lavado. Sin pretender limitarse a la teoría, la etapa de congelación y posterior descongelación 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, es posible suspender las células en una solución de congelación. Si bien se conocen en la

5 técnica muchas soluciones de congelación y parámetros y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contenga DMSO al 20 % y albúmina de suero humano al 8 %, o un medio de cultivo que contenga dextrano 40 al 10% y dextrosa al 5 %, albúmina de suero humano al 20 % y DMSO al 7,5 %, o Plasmalyte-A al 31,25 %, 31,25 % de dextrosa al 5 %, NaCl al 0,45 %, dextrano 40 al 10 % y dextrosa al 5 %, albúmina de suero humano al 20 % y DMSO al 7,5 % u otro medio de congelación celular adecuado que contenga, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A, 10 después se congelan las células 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. Es posible usar otros métodos de congelación controlada, así como congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido. En determinados aspectos, las células criopreservadas se descongelan y se lavan tal como se describe en la presente y se las deja en reposo durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación con los métodos de la presente invención.

15 También se describe la recolección de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior a cuando se puedan necesitar las células expandidas descritas en la presente. Como tal, la fuente de células que se van a expandir se puede recolectar en cualquier momento necesario y es posible aislar las células deseadas, tales como linfocitos T, y congelarlas para su uso posterior en la terapia con linfocitos T para cualquier 20 cantidad de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con linfocitos T, tal como las que se describen en la presente. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o aféresis de un sujeto sano en términos generales. En determinados aspectos, se toma una muestra de sangre o aféresis de un sujeto en términos generales sano, que padece el riesgo de desarrollar una enfermedad, pero aún no ha desarrollado tal enfermedad, y se aíslan 25 las células de interés y se congelan para su uso posterior. En determinados aspectos, es posible expandir, congelar y usar en un momento posterior los linfocitos T. En determinados aspectos, se recolectan muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular tal como se describe en la presente, pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, se aíslan las células de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes 30 de cualquier cantidad de modalidades de tratamiento pertinentes, inclusive, de modo no taxativo, tratamientos con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como alemtuzumab, anticuerpos anti-CD3, citoxan, fludarabina, ciclosporina, FK506, 35 rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

También se describe que se obtienen linfocitos T de un paciente directamente después del tratamiento que deja al 35 sujeto con linfocitos T funcionales. A este respecto, se ha observado que después de determinados tratamientos contra el cáncer, en tratamientos particulares con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en el que los pacientes normalmente se recuperarían del tratamiento, la calidad de los linfocitos T obtenidos puede ser óptima o mejorada por su capacidad de expandirse *ex vivo*. Asimismo, después de la manipulación *ex vivo* con los métodos descritos en la presente, estas células pueden encontrarse en un estado 40 preferido para la realización mejorada de injertos y la expansión *in vivo*. Por tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención recolectar células sanguíneas, inclusive linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante la fase de recuperación. Además, en aspectos adicionales, los regímenes de movilización (por ejemplo, movilización con GM-CSF) y acondicionamiento se pueden usar para crear una condición 45 en un sujeto donde se favorezca la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos celulares particulares, especialmente durante una ventana definida de tiempo después de la terapia. Los tipos de células ilustrativas incluyen linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

Activación y expansión de linfocitos T

50 Es posible activar los linfocitos T y expandirlos en términos generales mediante el uso de métodos como los descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041 y 7.572.631.

55 En general, los linfocitos T de la invención pueden expandirse al contacto con una superficie que tiene unido un agente que estimula una señal asociada a un complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, es posible estimular las poblaciones de linfocitos T tal como se describe en la presente, tal como mediante el contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión al antígeno de este, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o mediante el contacto con un activador de la proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la 60 superficie de los linfocitos T, se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, es posible poner en contacto a una población de linfocitos T con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones adecuadas para estimular la proliferación de linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ o CD8+, se usa un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Es posible usar los ejemplos de anticuerpo anti-CD28 que 65 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacalone, Besancon, Francia), tal como se pueden usar otros métodos conocidos comúnmente en la técnica (Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, J. Exp. Med.

190(9):13191328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

Los linfocitos T que se han expuesto a diversos tiempos de estimulación pueden presentar diferentes características. Por ejemplo, los productos celulares mononucleares de sangre periférica con aféresis o sangre típicos tienen una población de linfocitos T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (TC, CD8+). La expansión *ex vivo* de los linfocitos T mediante la estimulación de receptores CD3 y CD28 produce una población de linfocitos T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en linfocitos TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de linfocitos T comprende una población gradualmente mayor de linfocitos TC. Por consiguiente, según el fin del tratamiento, infundir a un sujeto con una población de linfocitos T que comprende predominantemente linfocitos TH puede resultar ventajoso. De manera similar, si se aisló un subconjunto específico para el antígeno de linfocitos TC, puede ser beneficioso expandir este subconjunto a un grado mayor.

Adicionalmente, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en su mayor parte, de forma reproducible durante el transcurso del proceso de expansión celular. Por tanto, tal capacidad de reproducción habilita la capacidad de ajustar un producto de linfocitos T activado para fines específicos.

Una vez que se construye una TFP anti-mesotelina, es posible usar varios ensayos para evaluar la actividad de la molécula, tal como, de modo no taxativo, la capacidad de expandir linfocitos T después de la estimulación con antígenos, mantener la expansión de linfocitos T sin volver a estimular y actividades anticancerosas en modelos adecuados *in vitro* y en animales. Los ensayos para evaluar los efectos de una TFP anti-mesotelina se describen con mayor detalle más adelante

El análisis de transferencia Western de la expresión de TFP en linfocitos T primarios se puede usar para detectar la presencia de monómeros y dímeros (por ejemplo, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Muy brevemente, se expanden los linfocitos T (1:1 mezcla de linfocitos T CD4+ y CD8+) que expresan las TFP *in vitro* durante más de 10 días seguido por la lisis y SDS-PAGE en condiciones de reducción. Las TFP se detectan mediante transferencia Western mediante el uso de un anticuerpo a una cadena TCR. Se usan los mismos subconjuntos de linfocitos T para el análisis SDS-PAGE en condiciones de no reducción para permitir la evaluación de la formación de dímeros covalentes.

La expansión *in vitro* de linfocitos T TFP+ después de la estimulación con antígenos puede medirse mediante citometría de flujo. Por ejemplo, se estimula una mezcla de linfocitos T CD4+ y CD8+ con alfaCD3/alfaCD28 y APC seguido por la transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores que se van a analizar. Los ejemplos de promotores incluyen promotores del gen CMV IE, EF-1alfa, ubiquitina C o fosfoglicerocinasa (PGK). Se evalúa la fluorescencia GFP en el día 6 de cultivo en los subconjuntos de linfocitos T CD4+ y/o CD8+ mediante citometría de flujo (véase, por ejemplo, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). De manera alternativa, se estimula una mezcla de linfocitos T CD4+ y CD8+ con microesferas magnéticas cubiertas con alfaCD3/alfaCD28 en el día 0, y se transduce con TFP en el día 1 mediante el uso de un vector lentiviral bicistrónico que expresa TFP junto con eGFP mediante el uso de una secuencia de omisión de ribosoma 2A. Se volvieron a estimular los cultivos con células K562 mesotelina+ (K562-mesotelina), células K562 de tipo salvaje (K562 tipo salvaje) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia del anticuerpo antiCD3 y anti-CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se agregó IL-2 exógeno a los cultivos cada dos días a 100 IU/ml. Se enumeran los linfocitos T GFP+ mediante citometría de flujo mediante el uso de recuento basado en microesferas (véase, por ejemplo, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)).

También es posible medir la expansión de linfocitos T TFP+ sostenida sin volver a estimular (véase, por ejemplo, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Brevemente, se mide el volumen medio de linfocitos T (fl) en el día 8 del cultivo mediante el uso de un contador de partículas Coulter Multisizer III después de la estimulación con microesferas magnéticas cubiertas con alfaCD3/alfaCD28 en el día 0, y la transducción con la TFP indicada en el día 1.

También es posible usar modelos animales para medir una actividad de TFP-T. Por ejemplo, un modelo de xenoinjertos mediante el uso de linfocitos T humanos TFP+ específicos para mesotelina para tratar un cáncer en ratones inmunodeficientes (véase, por ejemplo, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Muy brevemente, después de establecer el cáncer, se aleatorizaron los ratones a grupos de tratamiento. Se inyectan de forma conjunta diferentes cantidades de linfocitos T modificados a una proporción de 1:1 en ratones NOD/SCID/ γ -/- con cáncer. Se evalúa la cantidad de copias de cada vector en el ADN de bazo de ratones en diversos momentos después de la inyección de linfocitos T. Se evalúan los animales en busca de cáncer en intervalos semanales. Se miden los conteos de células cancerosas mesotelina+ en sangre periférica en ratones que a los que se les inyectaron linfocitos T TFP+ alfamesotelina-zeta o linfocitos T transducidos de forma simulada. Se comparan las curvas de supervivencia para los grupos mediante el uso del ensayo de rango logarítmico. Además, también es posible analizar los conteos absolutos de linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica 4 semanas después de la inyección de linfocitos T en ratones NOD/SCID/ γ -/. Se les inyectaron células cancerosas a los ratones y 3 semanas después se les inyectaron linfocitos T modificados para expresar TFP mediante un vector lentiviral bicistrónico que codifica la TFP unida a eGFP. Se normalizaron los linfocitos T a linfocitos T GFP+ con procesamiento de 45-50 % al mezclar con células transducidas

de forma simulada antes de la inyección, y se confirmó mediante citometría de flujo. Se evalúan los animales en busca de cáncer en intervalos de 1 semana. Se comparan las curvas de supervivencia para los grupos de linfocitos T TFP+ mediante el uso del ensayo de rango logarítmico.

- 5 Es posible evaluar la respuesta al tratamiento con TFP dependiente de la dosis (véase, por ejemplo, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Por ejemplo, se obtiene sangre periférica 35-70 días después de establecer el cáncer en ratones a los que se inyectó en el día 21 con linfocitos T TFP, una cantidad equivalente de linfocitos T transducidos de forma simulada o sin linfocitos T. Se extrajo sangre a los ratones de cada grupo de forma aleatoria para la determinación de los conteos de células cancerosas mesotelina+ de sangre periférica y después se sacrifican en los días 35 y 49. Se evaluó al resto de los animales en los días 57 y 70.

10 La evaluación de la proliferación celular y la producción de citocinas se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Brevemente, la evaluación de proliferación mediada por TFP se lleva a cabo en placas de microtitulación al mezclar linfocitos T lavados con células que expresan mesotelina o CD32 y CD137 (KT32-BBL) para una proporción final de linfocitos T:célula que expresa mesotelina de 2:1. Se irradiaron las células que expresan mesotelina con radiación gamma antes de su uso. Se agregan anticuerpos monoclonales anti-CD3 (clon OKT3) y anti-CD28 (clon 9.3) a los cultivos con células KT32-BBL para que sirvan como control positivo para la estimulación de la proliferación de linfocitos T dado que estas señales respaldan la expansión a largo plazo de los linfocitos T CD8+ *ex vivo*. Se enumeran los linfocitos T en cultivos mediante el uso de las microesferas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen) y citometría de flujo, tal como lo describe el fabricante. Se identifican los linfocitos T TFP+ mediante expresión de GFP mediante el uso de linfocitos T que se modificaron con vectores lentivirales que expresan TFP unidos a eGFP-2A. Para los linfocitos T TFP+ que no expresan GFP, se detectan los linfocitos T TFP+ con proteína mesotelina recombinante biotinilada y un conjugado secundario de avidina-PE. La expresión de CD4+ y CD8+ en linfocitos T también se detecta de forma simultánea con anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences). Se llevan a cabo mediciones de citocina en sobrenadantes recolectados 24 horas después de volver a estimular mediante el uso del kit de determinación de citocinas de tipo TH1/TH2 humanas con matriz citométrica de microesferas (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se evalúa la fluorescencia mediante el uso de un citómetro de flujo FACScalibur y se analizan los datos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 30 Es posible evaluar la citotoxicidad mediante un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr (véase, por ejemplo, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)). Brevemente, se cargan las células objetivo con ⁵¹Cr (como NaCrO₄, New England Nuclear) a 37 °C durante 2 horas con agitación frecuente, se lava dos veces en medio RPMI completo y se colocan en placas de microtitulación. Se mezclan los linfocitos T efectores con células objetivo en los pocillos en RPMI completo en diversas proporciones de linfocito efector:célula objetivo (E:T). También se preparan pocillos adicionales que contienen únicamente el medio (liberación espontánea, SR, por sus siglas en inglés) o una solución al 1 % de detergente triton-X 100 (liberación total, TR, por sus siglas en inglés). Después de 4 horas de incubación a 37 °C, se cultiva sobrenadante de cada pocillo. Después se mide el ⁵¹Cr liberado mediante el uso de un contador de partículas gamma (Packard Instrument Co., Waltham, Mass.). Cada condición se lleva a cabo al menos por triplicado y se calcula el porcentaje de lisis mediante el uso de la fórmula: % lisis=(ER-SR)/(TR-SR), donde ER representa el ⁵¹Cr promedio liberado para cada condición experimental.

40 45 50 55 Es posible usar tecnología de generación de imágenes para evaluar el tráfico específico y la proliferación de TFP en modelos animales que tienen tumores. Tales ensayos se han descrito, por ejemplo, en Barrett *et al.*, Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011). Brevemente, se inyecta a ratones NOD/SCID/yc-/ (NSG) IV con células cancerosas, seguidas 7 días después con linfocitos T, 4 horas después de la electroporación con las construcciones de TFP. Se transfecan de forma estable los linfocitos T con una construcción lentiviral para expresar la luciferasa de luciérnaga y se generan imágenes de los ratones en busca de bioluminiscencia. De manera alternativa, es posible medir la eficacia terapéutica y la especificidad de una inyección simple de linfocitos T TFP+ en el modelo de xenoinjertos de cáncer de la siguiente manera: Se les inyectan a los ratones NSG células cancerosas transducidas para expresar de forma estable la luciferasa de luciérnaga, seguido por una inyección simple en la vena de la cola de linfocitos T electroporados con TFP mesotelina 7 días después. Se generan imágenes de los animales en diversos momentos posteriores a la inyección. Por ejemplo, es posible generar mapas térmicos de la densidad de fotones de cáncer positivo para la luciferasa de luciérnaga en ratones representativos en el día 5 (2 días antes del tratamiento) y el día 8 (24 horas después de PBL TFP+).

También es posible usar otros ensayos, inclusive aquellos descritos en la sección de Ejemplos en la presente, así como aquellos conocidos en la técnica, para evaluar las construcciones de TFP anti-mesotelina de la invención.

60 Aplicaciones terapéuticas

Enfermedades y/o trastornos asociados con mesotelina

65 En un aspecto, la invención proporciona composiciones y productos para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina. En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad donde parte del tumor es negativo para mesotelina y parte del tumor es positivo para mesotelina. Por

ejemplo, la TFP de la invención es útil para el tratamiento de sujetos que han experimentado un tratamiento para una enfermedad asociada con la expresión elevada de mesotelina, donde el sujeto que ha experimentado un tratamiento para niveles elevados de mesotelina presenta una enfermedad asociada con niveles elevados de mesotelina.

- 5 En un aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende una TFP anti-mesotelina que se enlaza de forma operativa al promotor para la expresión en linfocitos T de mamífero. En un aspecto, la invención proporciona un linfocito T recombinante que expresa la TFP mesotelina para su uso en el tratamiento de tumores que expresan mesotelina, donde el linfocito T recombinante que expresa la TFP de mesotelina se denomina TFP-T mesotelina. En un aspecto, la TFP-T mesotelina de la invención es capaz de poner en contacto una célula tumoral con al menos una TFP mesotelina de la invención expresada en su superficie de modo que la TFP-T seleccione como objetivo la célula tumoral y se inhiba el crecimiento del tumor.

10 En un aspecto, la invención se refiere a un método de inhibición del crecimiento de una célula tumoral que exprese mesotelina, que comprende el contacto de la célula tumoral con un linfocito T TFP mesotelina de la presente invención de modo que TFP-T se active como respuesta al antígeno y seleccione como objetivo la célula cancerosa, donde se inhiba el crecimiento del tumor.

15 En un aspecto, la invención se refiere a composiciones y productos para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto. El método comprende la administración al sujeto de un linfocito T TFP mesotelina de la presente invención, de modo que se trate el cáncer en el sujeto. Un ejemplo de un cáncer que se puede tratar mediante el linfocito T TFP mesotelina de la invención es un cáncer asociado con la expresión de mesotelina. En un aspecto, el cáncer es mesotelioma. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de páncreas. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de ovario. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de estómago. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de pulmón. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de endometrio. En algunas modalidades, una terapia con TFP mesotelina se puede usar combinada con una o más terapias adicionales.

20 La invención incluye un tipo de terapia celular donde los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar una TFP y se infunde el linfocito T que expresa TFP a un receptor que lo necesite. La célula infundida es capaz de eliminar las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, los linfocitos T que expresan TFP son capaces de replicarse *in vivo*, lo que produce una continuidad a largo plazo que puede llevar a un control tumoral sostenido. En varios aspectos, los linfocitos T administrados al paciente, o su descendencia, persisten en el paciente durante al menos un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, diecisésis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración del linfocito T al paciente.

25 La invención incluye también un tipo de terapia celular donde los linfocitos T se modifican, por ejemplo, mediante ARN transrito *in vitro*, para expresar de forma transitoria una TFP y el linfocito T que expresa TFP se infunde en un receptor que lo necesite. La célula infundida es capaz de eliminar las células tumorales en el receptor. Por tanto, en diversos aspectos, los linfocitos T administrados al paciente se encuentran presentes durante menos de un mes, por ejemplo, tres semanas, dos semanas o una semana, después de la administración del linfocito T al paciente.

30 Sin pretender limitarse a ninguna teoría particular, la respuesta inmunitaria antitumoral provocada por los linfocitos T que expresan TFP puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o de manera alternativa puede deberse a una respuesta inmunitaria directa en oposición a una indirecta. En un aspecto, los linfocitos T transducidos con TFP presentan secreción de citocinas proinflamatoria específica y actividad citolítica potente como respuesta a las células cancerosas humanas que expresan el antígeno mesotelina, resisten la inhibición de mesotelina soluble, median en la eliminación por vecindad y median en la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células tumorales sin antígeno dentro de un campo heterogéneo de tumores que expresan mesotelina pueden ser susceptibles a la destrucción indirecta mediante linfocitos T con redirección de mesotelina que ha reaccionado anteriormente contra células cancerosas contiguas positivas para el antígeno.

35 En un aspecto, los linfocitos T modificados con TFP humanos de la invención pueden ser de un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

40 Con respecto a la inmunización *ex vivo*, se da al menos uno de los siguientes *in vitro* antes de la administración de la célula al mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica una TFP a las células o iii) criopreservación de las células.

45 Los procedimientos *ex vivo* son conocidos en la técnica y se tratan de forma más completa más adelante. Brevemente, se aíslan las células de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfecan *in vitro*) con un vector que expresa una TFP descrita en la presente. La célula modificada con TFP se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con TFP puede ser autóloga respecto al receptor. De manera alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas respecto al receptor.

- El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células progenitoras y madre hematopoyéticas se describe en la patente estadounidense n.º 5.199.942, puede aplicarse a las células de la presente invención. Se conocen otros métodos adecuados en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. Brevemente, el cultivo *ex vivo* y la expansión de los linfocitos T comprende: (1) recolectar células progenitoras y madre hematopoyéticas CD34+ de un mamífero del cultivo de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir tales células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en las patentes estadounidenses n.º 5.199.942, es posible usar otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- Además del uso de una vacuna basada en células en cuanto a la inmunización *ex vivo*, la presente invención proporciona también composiciones para la inmunización *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.
- En general, las células activadas y expandidas como se describe en la presente se pueden usar en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surjan en individuos inmunodeprimidos. En particular, los linfocitos T modificados con TFP de la invención se usan en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de mesotelina. En determinados aspectos, las células de la invención se usan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de mesotelina. Por tanto, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de mesotelina, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos T modificados con TFP de la invención.
- En un aspecto, los linfocitos T TFP de la invención puede ser para su uso para tratar una enfermedad proliferativa tal como un cáncer o neoplasia maligna o afección precancerosa. En un aspecto, el cáncer es mesotelioma. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de páncreas. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de ovario. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de estómago. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de pulmón. En un aspecto, el cáncer es un cáncer de endometrio. Además, una enfermedad asociada con la expresión de mesotelina incluye, de modo no taxativo, por ejemplo, cánceres, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas atípicas y/o no clásicas que expresan mesotelina. Los síntomas no relacionados con cáncer asociados con la expresión de mesotelina incluyen, por ejemplo, de modo no taxativo, enfermedades autoinmunitarias, (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes.
- Los linfocitos T modificados con TFP de la presente invención se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica combinados con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares.
- La presente invención proporciona también composiciones y productos para su uso en la inhibición de la proliferación o reducción de una población de células que expresa mesotelina, donde tales métodos comprenden poner en contacto una población de células que comprenden una célula que expresa mesotelina con un linfocito T-TFP anti-mesotelina de la invención que se une a la célula que expresa mesotelina. En un aspecto específico, la presente invención proporciona métodos para la inhibición de la proliferación o reducción de la población de células cancerosas que expresen mesotelina, donde tales métodos comprenden el contacto de la población de células cancerosas que expresa mesotelina con un linfocito T-TFP anti-mesotelina de la invención que se une a la célula que expresa mesotelina. En un aspecto, la presente invención es para su uso para la inhibición de la proliferación o reducción de la población de células cancerosas que expresen mesotelina, donde tales métodos comprenden el contacto de la población de células cancerosas que expresa mesotelina con un linfocito T-TFP anti-mesotelina de la invención que se une a la célula que expresa mesotelina. En determinados aspectos, el linfocito T-TFP anti-mesotelina de la invención reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 65 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 95 % o al menos 99 % en un sujeto con cáncer, o un modelo animal de este, asociado con células que expresan mesotelina respecto a un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.
- La presente invención también proporciona composiciones y productos para prevenir, tratar y/o manejar una enfermedad asociada con células que expresan mesotelina (por ejemplo, un cáncer que expresa mesotelina), donde tales métodos comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de un linfocito T-TFP anti-mesotelina de la invención que se une a la célula que expresa mesotelina. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Los ejemplos no taxativos de trastornos asociados con células que expresan mesotelina incluyen trastornos autoinmunes (tales como lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de pulmón o cáncer de endometrio, o cánceres atípicos que expresan mesotelina).
- La presente invención también proporciona composiciones y productos para prevenir, tratar y/o manejar una enfermedad asociada con células que expresan mesotelina, donde tales métodos comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de un linfocito T-TFP anti-mesotelina de la invención que se une a la célula que expresa mesotelina. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

La presente invención incluye prevenir la recidiva de un cáncer asociado con células que expresan mesotelina, donde tales métodos comprenden la administración a un sujeto que lo necesite de un linfocito T-TFP anti-mesotelina de la invención que se une a la célula que expresa mesotelina. En un aspecto, los métodos comprenden la administración al sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de un linfocito T-TFP anti-mesotelina descrito en la presente que se une a la célula que expresa mesotelina-bmc en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

5

Terapias de combinación

Una célula que expresa una TFP descrita en la presente puede usarse combinada con otros agentes y terapias 10 conocidas. Tal como se usa en la presente, administración "combinada" significa que se administran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el transcurso del padecimiento del trastorno por parte del sujeto, por ejemplo, se administran los dos o más tratamientos después de haber diagnosticado al sujeto con el trastorno y antes de curar o eliminar el trastorno o de interrumpir el tratamiento por otros motivos. En algunas modalidades, la administración de 15 un tratamiento sigue en curso cuando inicia la administración del segundo, de forma que exista superposición en términos de administración. Algunas veces se refiere a esto como "administración simultánea" o "administración concurrente". En otras modalidades, la administración de un tratamiento termina antes de que comience la administración del otro tratamiento. En algunas modalidades de cualquiera de los casos, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce en gran medida los síntomas 20 que lo que se observaría si se administrara el segundo tratamiento en ausencia del primer tratamiento o se observa la situación análoga con el primer tratamiento. En algunas modalidades, la administración es tal que la reducción de un síntoma u otro parámetro relativo al trastorno es mayor que la que se observaría con la administración de un tratamiento en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, completamente 25 aditivo o mayor que aditivo. La administración puede ser tal que aún pueda detectarse un efecto del primer tratamiento administrado cuando se administra el segundo.

En algunas modalidades, "al menos un agente terapéutico adicional" incluye una célula que expresa TFP. También se proporcionan linfocitos T que expresan múltiples TFP, que se unen a los mismos antígenos objetivo o a unos 30 diferentes, o a los mismos epítopos o unos diferentes en el mismo antígeno objetivo. También se proporcionan en la presente poblaciones de linfocitos T en las cuales un primer subconjunto de linfocitos T expresa una primera TFP y un segundo subconjunto de linfocitos T que expresa una segunda TFP.

Es posible administrar una célula que expresa TFP descrita en la presente y al menos un agente terapéutico adicional 35 de forma simultánea, en la misma composición o en una aparte, o en forma secuencial. En el caso de administración secuencial, la célula que expresa TFP descrita en la presente puede administrarse primero y el agente adicional puede administrarse segundo, o es posible invertir el orden de administración.

En aspectos adicionales, una célula que expresa TFP descrita en la presente puede usarse en una pauta de 40 tratamiento combinada con cirugía, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos, u otros agentes inmunoablativos tales como alemtuzumab, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Una célula que expresa TFP descrita en la presente puede usarse también en combinación con una vacuna peptídica, tal como la que se describe en Izumoto *et al.*, 2008 J Neurosurg 108:963-971. En un aspecto adicional, una célula que expresa TFP descrita en la 45 presente también puede usarse en combinación con un promotor de diferenciación de células mieloides (por ejemplo, ácido retinoico completamente trans), un inhibidor de la expansión de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, inhibidores del receptor de c-kit o un inhibidor de VEGF), una inhibición de la función de MDSC (por ejemplo, inhibidores de COX2 o inhibidores de fosfodiesterasa-5) o la eliminación terapéutica de MDSC (por ejemplo, con un régimen quimioterapéutico, tal como tratamiento con doxorubicina y 50 ciclofosfamida). Otros agentes terapéuticos que pueden prevenir la expansión de MDSC incluyen amino-bifosfonato, bifosfonato, sildenafilo y tadalafilo, nitroaspirina, vitamina D3 y gencitabina (véase, por ejemplo, Gabrilovich y Nagaraj, Nat. Rev. Immunol., (2009) v9(3): 162-174).

En una modalidad, es posible administrar al sujeto un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado con 55 la administración de una célula que expresa TFP. Los efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa TFP incluyen, de modo no taxativo, síndrome de liberación de citocina (CRS, por sus siglas en inglés) y linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH, por sus siglas en inglés), también denominada síndrome de activación de macrófagos (SAM). Los síntomas de CRS incluyen fiebre alta, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia y similares. Por consiguiente, los métodos descritos en la presente pueden comprender la administración de una célula que expresa TFP descrita en la presente a un sujeto y la administración adicional de un agente para manejar los niveles elevados de un factor soluble producto del tratamiento con una célula que expresa TFP. En una modalidad, el factor soluble elevado en el sujeto es uno o más de IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-6 e IL8. Por lo tanto, un agente administrado para tratar este efecto secundario puede ser un agente que neutralice uno o más de estos factores solubles. Tales agentes incluyen, de modo no taxativo, un esteroide, un inhibidor de TNF α y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor 60 de TNF α es entanercept. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es tocilizumab (toc).

- En una modalidad, es posible administrar al sujeto un agente que mejora la actividad de una célula que expresa TFP. Por ejemplo, en una modalidad, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. En algunas modalidades, las moléculas inhibidoras, por ejemplo, muerte programada 1 (PD1), pueden disminuir la capacidad de una célula que expresa TFP de generar una respuesta inmunitaria efectora. Los ejemplos de moléculas inhibidoras
- 5 incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante la inhibición en el nivel del ADN, ARN o proteico, puede optimizar el rendimiento de una célula que expresa TFP. En modalidades, es posible usar un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, ARNb, por ejemplo, un ARNip o ARNhp, para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula que expresa TFP. En una modalidad, el inhibidor es un ARNhp. En una modalidad, la
- 10 molécula inhibidora se inhibe dentro de una célula que expresa TFP. En estas modalidades, una molécula de ARNbca que inhibe la expresión de la molécula inhibidora se enlaza al ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, de la TFP. En una modalidad, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab (al que
- 15 también se hace referencia como MDX-010 y MDX-101, y se comercializa como Yervoy™; Bristol-Myers Squibb; tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer, conocido anteriormente como ticilimumab, CP-675.206)). En una modalidad, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a TIM3. En una modalidad, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a LAG3.
- 20 En algunas modalidades, los linfocitos T pueden alterarse (por ejemplo, mediante transferencia genética) *in vivo* mediante un lentivirus, por ejemplo, un lentivirus que se dirige específicamente a un linfocito T CD4+ o CD8+ (véase, por ejemplo, Zhou *et al.*, J. Immunol. (2015) 195:2493-2501).
- 25 En algunas modalidades, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa TFP puede ser, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, donde el primer dominio es una molécula inhibidora, o fragmento de esta, y el segundo dominio es un polipéptido que se asocia con una señal positiva, por ejemplo, un polipéptido que comprende un dominio de señalización intracelular tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el polipéptido que se asocia con una señal positiva puede incluir un dominio coestimulador de CD28, CD27, ICOS, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular de CD28, CD27 y/o ICOS, y/o un dominio
- 30 de señalización primario, por ejemplo, de CD3 zeta, por ejemplo, tal como se describe en la presente. En una modalidad, la proteína de fusión se expresa mediante la misma célula que expresó la TFP. En otra modalidad, la proteína de fusión se expresa mediante una célula, por ejemplo, un linfocito T que no expresa una TFP anti-mesotelina.
- 35 En algunas modalidades, el dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno que es un dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico o un anticuerpo que comprende el dominio de unión a anti-mesotelina, o una célula que expresa el dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico tiene un valor de afinidad de como máximo alrededor de 200 nM, 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM; y/o alrededor de 200 nM, 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM.
- 40 En algunas modalidades, el dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno que es un dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico o un anticuerpo que comprende el dominio de unión a anti-mesotelina, o una célula que expresa el dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico tiene un valor de afinidad de como máximo alrededor de 200 nM, 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM; y/o alrededor de 200 nM, 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM.
- 45 En algunas modalidades, el dominio de anticuerpo humano o humanizado que comprende un dominio de unión al antígeno que es un dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico o un anticuerpo que comprende el dominio de unión a anti-mesotelina, o una célula que expresa el dominio de unión a anti-mesotelina codificado por el ácido nucleico tiene un valor de afinidad de como máximo alrededor de 200 nM, 100 nM, 75 nM, a 50 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, 0,09 nM, 0,08 nM, 0,07 nM, 0,06 nM, 0,05 nM, 0,04 nM, 0,03 nM, 0,02 nM o 0,01 nM.

Composiciones farmacéuticas

- 50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una célula que expresa TFP, por ejemplo, múltiples células que expresan TFP, tal como se expone según la invención en la presente, combinada con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender amortiguadores como solución salina amortiguada neutral, solución salina amortiguada con fosfato y similares; carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos como glicina; antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y conservantes. Las composiciones de la presente invención se encuentran formuladas, en un aspecto, para administración intravenosa.

- 60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en una forma adecuada para la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de la administración se determinará mediante tales factores como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosificaciones adecuadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

- 65 En una modalidad, la composición farmacéutica se encuentra considerablemente libre, por ejemplo, no hay niveles detectables, de un contaminante, por ejemplo, que se selecciona del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente para replicación (RCL), p24, ácido nucleico VSV-G, gag VIH, microesferas cubiertas con anti-CD3/anti-CD28 residual, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino,

componentes de medios de cultivo, célula empaquetadora de vector o componentes de plásmidos, una bacteria y un hongo. En una modalidad, la bacteria es al menos una que se selecciona del grupo que consiste en *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* y *Streptococcus pyogenes* grupo A.

5 Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz para inhibir un tumor" o "una cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención que se deberá administrar puede determinarla un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y afección del paciente (sujeto). Es posible establecer 10 en forma general que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en la presente se puede administrar a una dosificación de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, inclusive todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también 15 se pueden administrar múltiples veces en esas dosificaciones. Las células se pueden administrar mediante técnicas de infusión comúnmente conocidas en inmunoterapia (ver, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

En determinados aspectos, puede ser deseable administrar linfocitos T activados a un sujeto y después volver a extraer 20 sangre posteriormente (o llevar a cabo una aféresis), activar los linfocitos T de estos de acuerdo con la presente invención y volver a infundir al paciente con estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En determinados aspectos, es posible activar los linfocitos T a partir de 25 extracciones de sangre de 10 cm^3 a 400 cm^3 . En determinados aspectos, se activan los linfocitos T a partir de extracciones de sangre de 20 cm^3 , 30 cm^3 , 40 cm^3 , 50 cm^3 , 60 cm^3 , 70 cm^3 , 80 cm^3 , 90 cm^3 o 100 cm^3 .

25 La administración de las composiciones presentadas puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, inclusive mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar a pacientes de forma transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o de manera intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de linfocitos T de la presente invención se administran a un paciente mediante 30 inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones de linfocitos T de la presente invención se administran mediante inyección i.v. Las composiciones de linfocitos T pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

35 En un ejemplo de aspecto particular, los sujetos pueden someterse a leucaférésis, donde los leucocitos se recolectan, se enriquecen o se reducen *ex vivo* para seleccionar y/o aislar las células de interés, por ejemplo, linfocitos T. Estas cepas de linfocitos T pueden expandirse mediante métodos conocidos en la técnica y tratarse de modo que una o más construcciones de TFP de la invención puedan introducirse, lo que crea de este modo un linfocito T que expresa TFP de la invención. Los sujetos que lo necesitan pueden someterse posteriormente a tratamiento estándar con una 40 quimioterapia de dosis elevada seguido por trasplante de células madre de sangre periférica. En determinados aspectos, después o de manera simultánea con el trasplante, los sujetos reciben una infusión de los linfocitos T TFP expandidos de la presente invención. En un aspecto adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

45 La dosificación de los tratamientos anteriores que se van a administrar a un paciente variará con la naturaleza exacta de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. El cambio de escala de las dosificaciones para administración a seres humanos se puede llevar a cabo de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para alemtuzumab, por ejemplo, se encontrará generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, normalmente se administra únicamente durante un período de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día si bien en algunos casos es posible usar dosis mayores de hasta 40 mg por día (descrito en la patente estadounidense n.º 6.120.766).

50 En una modalidad, la TFP se introduce en linfocitos T, por ejemplo, mediante el uso de transcripción *in vitro*, y el sujeto (por ejemplo, un ser humano) recibe una administración inicial de linfocitos T TFP de la invención, y una o más administraciones posteriores de los linfocitos T TFP de la invención, donde una o más administraciones posteriores se administran durante menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la 55 administración previa. En una modalidad, se administran más de una administración de los linfocitos T TFP de la invención al sujeto (por ejemplo, un ser humano) por semana, por ejemplo, se administran 2, 3 o 4 administraciones de los linfocitos T TFP de la invención por semana. En una modalidad, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) recibe más de una administración de los linfocitos T TFP por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones por semana) (a lo que también se hace referencia en la presente como un ciclo), seguido por una semana sin administraciones de 60 linfocitos T TFP, y después se administran una o más administraciones adicionales de los linfocitos T TFP (por ejemplo, más de una administración de los linfocitos T TFP por semana) al sujeto. En otra modalidad, el sujeto (por ejemplo, un ser humano) recibe más de un ciclo de linfocitos T TFP, y el tiempo entre cada ciclo es menor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En una modalidad, los linfocitos T TFP se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En una modalidad, los linfocitos T TFP de la invención se administran durante al menos dos, tres, cuatro, 65 cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

En un aspecto, los linfocitos T TFP mesotelina se generan mediante el uso de vectores virales lentivirales, tales como lentivirus. Los linfocitos T TFP generados de ese modo tienen expresión estable de TFP.

En un aspecto, los linfocitos T TFP expresan de forma transitoria los vectores TFP durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La expresión transitoria de las TFP se puede ver afectada por la administración de un vector de TFP de ARN. En un aspecto, el ARN de TFP se transduce en el linfocito T mediante electroporación.

Un posible problema que puede surgir en pacientes tratados con linfocitos T que expresan en forma transitoria TFP (particularmente con linfocitos T TFP que tienen scFv murino) es la anafilaxis después de múltiples tratamientos.

Sin pretender limitarse a esta teoría, se cree que tal respuesta anafiláctica puede ser provocada porque el paciente desarrolla una respuesta humorla anti-TFP, es decir, anticuerpos anti-TFP que tienen un isotipo anti-IgE. Se cree que las células de producción de anticuerpos de un paciente sufren un cambio de clase del isotipo IgG (que no genera anafilaxis) al isotipo IgE cuando hay un descanso de diez a catorce días en la exposición al antígeno.

Si un paciente tiene un riesgo elevado de generar una respuesta de anticuerpos anti-TFP durante el transcurso de la terapia transitoria con TFP (tal como los que se generan por transducciones de ARN), los descansos de infusión de linfocitos T TFP no debería durar más de diez a catorce días.

20

Ejemplos

La invención se describe en mayor detalle mediante la referencia a los ejemplos experimentales que siguen. Estos ejemplos se proporcionan solamente a efectos ilustrativos y no se pretende que sean limitativos a menos que se especifique de otra manera. Por lo tanto, no debería interpretarse de forma alguna que la invención se limite a los ejemplos que figuran a continuación, sino que debería interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que resulten evidentes a partir de las indicaciones que se proporcionan en la presente. Sin descripción adicional, se considera que un experto en la técnica, mediante la descripción que antecede y los ejemplos ilustrativos que siguen, puede elaborar y usar las composiciones de la presente invención y poner en práctica los métodos que se reivindican.

30 Los ejemplos prácticos que figuran a continuación señalan específicamente los diversos aspectos de la presente invención, y no debe interpretarse que limiten de forma alguna al resto de la descripción.

Ejemplo 1: Construcciones de TFP

35 Se modificaron construcciones de TFP anti-mesotelina mediante clonación de un fragmento de ADN de scFv anti-mesotelina unido a un fragmento de ADN de CD3 o TCR mediante una secuencia de ADN que codifica un enlazador corto (SL): AAAGGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO: 2) o un enlazador largo (LL): AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO: 3) en el vector p510 ((System Biosciences (SBI)) en los sitios XbaI y EcoR1 .

40 Las construcciones de TFP anti-mesotelina generadas son p510_antimesothelin_LL_TCRα (scFv anti-mesotelina – enlazador largo- cadena α del receptor de linfocitos T humano de longitud completa), p510_antimesothelin_LL_TCRαC (scFv anti-mesotelina – enlazador largo- cadena de dominio constante α del receptor de linfocitos T humano), p510_antimesothelin_LL_TCRβ (scFv anti-mesotelina – enlazador largo- cadena β del receptor de linfocitos T humano de longitud completa), p510_antimesothelin_LL_TCRβC (scFv anti-mesotelina – enlazador largo- cadena de dominio constante β del receptor de linfocitos T humano), p510_antimesothelin_LL_CD3γ (scFv anti-mesotelina – enlazador largo- cadena CD3γ humana), p510_antimesothelin_LL_CD3δ (scFv anti-mesotelina – enlazador largo- cadena CD3δ humana), p510_antimesothelin_LL_CD3ε (scFv anti-mesotelina – enlazador largo- cadena CD3ε humana), p510_antimesothelin_SL_TCRβ (scFv anti-mesotelina – enlazador corto- cadena β del receptor de linfocitos T humano de longitud completa), p510_antimesothelin_SL_CD3γ (scFv anti-mesotelina – enlazador corto- cadena CD3γ humana), p510_antimesothelin_SL_CD3δ (scFv anti-mesotelina – enlazador corto- cadena CD3δ humana), p510_antimesothelin_SL_CD3ε (scFv anti-mesotelina – enlazador corto- cadena CD3ε humana).

45 55 La construcción de CAR anti-mesotelina, p510_antimesothelin_28ζ, se genera mediante clonación de ADN sintético que codifica anti-mesotelina, dominio extracelular de CD28 parcial, dominio transmembrana de CD28, dominio intracelular de CD28 y CD3 zeta en el vector p510 en los sitios XbaI y EcoR1.

Ejemplo 2: Secuencias de anticuerpos

60 Generación de secuencias de anticuerpos

La secuencia canónica de polipéptido de mesotelina humana es el n.º de registro de UniProt Q13421 (o Q13421-1). Se proporcionan polipéptidos de anticuerpo que son capaces de unirse específicamente al polipéptido de mesotelina humana y fragmentos o dominios de este. Es posible generar anticuerpos anti-mesotelina mediante el uso de diversas tecnologías (véase, por ejemplo, (Nicholson *et al.*, 1997). Cuando se usan anticuerpos murinos anti-mesotelina como material de partida, se desea la humanización de los anticuerpos murinos anti-mesotelina para el entorno clínico,

donde los residuos específicos para ratón pueden inducir una respuesta humana anti-antígeno de ratón (HAMA, por sus siglas en inglés) en sujetos que reciben el tratamiento con la proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR), es decir, el tratamiento con linfocitos T transducidos con la construcción de TFP.mesotelina . La humanización se logra mediante el injerto de regiones CDR de anticuerpos murinos anti-mesotelina en marcos aceptores de línea

5 germinal humana adecuados, que incluyen opcionalmente otras modificaciones a las regiones CDR y/o marco. Tal como se proporciona en la presente, la numeración de residuos de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos sigue a Kabat (Kabat E. A. et al., 1991; Chothia et al., 1987).

Generación de scFv

10 Se usan IgG humanas o humanizadas anti-mesotelina para generar las secuencias scFv para las construcciones TFP. Se obtienen las secuencias de ADN que codifican los dominios V_L y V_H humanos o humanizados y opcionalmente se optimizan los codones para las construcciones para la expresión en células de *Homo sapiens*. Se varía el orden en el cual aparecen los dominios V_L y V_H en el scFv (es decir, orientación V_L - V_H o V_H - V_L) y tres copias de la subunidad "G4S"

15 o "G4S" ($G_4S)_3$ conectan los dominios variables para crear el dominio scFv. Las construcciones de plásmidos scFv anti-mesotelina pueden tener etiquetas opcionales Flag, His u otras etiquetas de afinidad y se electroporan en HEK293 u otras líneas celulares de mamífero o ser humano adecuadas y se purifican. Los ensayos de validación incluyen análisis de unión mediante FACS, análisis cinético mediante el uso de Proteon y tinción de las células que expresan mesotelina.

20 Los ejemplos de dominios V_L y V_H , CDR anti-mesotelina y las secuencias de nucleótidos que los codifican pueden ser los que se describen en las patentes estadounidenses n.º: 9.272.002; 8.206.710; 9.023.351; 7.081.518; 8.911.732; 9.115.197 y 9.416.190; y la publicación de patente estadounidense n.º 20090047211. Otros ejemplos de dominios V_L y V_H , CDR anti-mesotelina y las secuencias de nucleótidos que los codifican, respectivamente, pueden ser los siguientes anticuerpos monoclonales: anticuerpo anti-mesotelina de rata 420411, anticuerpo anti-mesotelina de rata 420404, anticuerpo anti-mesotelina de ratón MN-1, anticuerpo anti-mesotelina de ratón MB-G10, anticuerpo anti-mesotelina de ratón ABIN233753, anticuerpo anti-mesotelina de conejo FQS3796(3), anticuerpo anti-mesotelina de conejo TQ85, anticuerpo anti-mesotelina de ratón TA307799, anticuerpo anti-mesotelina de rata 295D, anticuerpo anti-mesotelina de rata B35, anticuerpo anti-mesotelina de ratón 5G157, anticuerpo anti-mesotelina de ratón 129588, anticuerpo anti-mesotelina de conejo 11C187, anticuerpo anti-mesotelina de ratón 5B2, anticuerpo anti-mesotelina de conejo SP74, anticuerpo anti-mesotelina de conejo D4X7M, anticuerpo anti-mesotelina de ratón C-2, anticuerpo anti-mesotelina de ratón C-3, anticuerpo anti-mesotelina de ratón G-1, anticuerpo anti-mesotelina de ratón G-4, anticuerpo anti-mesotelina de ratón K1, anticuerpo anti-mesotelina de ratón B-3, anticuerpo anti-mesotelina de ratón 200-301-A87, anticuerpo anti-mesotelina de ratón 200-301-A88, anticuerpo anti-mesotelina de conejo EPR2685(2), anticuerpo anti-mesotelina de conejo EPR4509, o anticuerpo anti-mesotelina de conejo PPI-2e(IHC).

En algunas modalidades, se usan aglutinantes (V_{HH}) de dominio simple, tales como los establecidos en las SEQ ID NO 53-55 (SD1, SD4 y SD6, respectivamente).

Fuente de subunidades TCR

Todas las subunidades del complejo de receptor de linfocitos T (TCR) humanos contienen un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Un complejo humano TCR contiene el polipéptido CD3-épsilon, el polipéptido CD3-gamma, el polipéptido CD3-delta, el polipéptido CD3-zeta, el polipéptido de cadena alfa de TCR y el polipéptido de cadena beta de TCR. La secuencia canónica de polipéptido CD3-épsilon humano es el n.º de registro de Uniprot P07766. La secuencia canónica de polipéptido CD3-gamma humano es el n.º de registro de Uniprot P09693. La secuencia canónica de polipéptido CD3-delta humano es el n.º de registro de Uniprot P043234. La secuencia canónica de polipéptido CD3-zeta humano es el n.º de registro de Uniprot P20963. La secuencia canónica de cadena alfa de TCR humana es el n.º de registro de Uniprot Q6ISU1. La secuencia canónica de región C de cadena beta de TCR humana es el n.º de registro de Uniprot P01850, una secuencia de región V de cadena beta de TCR es P04435.

La secuencia canónica del polipéptido CD3-épsilon humano es:

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHND
 KNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMED
 VMSVATIVIVDICITGGLLLVYYWSKNRKA
 KAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEP
 IRKGQRDLYSGLNQRRI (SEQ ID NO:4).

La secuencia canónica del polipéptido CD3-gamma humano es:

MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMICF
LTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFV
LAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID
NO:5).

La secuencia canónica del polipéptido CD3-delta humano es:

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELDRVFN CNTSITWVEGTVGTL SDITRLDLGKRILD P
RGICYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCAGHETGR
5 LSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS (SEQ ID NO:6).

La secuencia canónica del polipéptido CD3-zeta humano es:

MWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTAFLRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNENLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:7).

10 La secuencia canónica de la cadena alfa de TCR humana es:

MAGTWLLLLALGCPALPTGVGGTPPSLAPPIMLLVDGKQQMVVCLVLDVAPPGLDSPIWFS
AGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNL AHLSLPSEELASWEPLVCHTGPAGAEHSRSTQPMHLSGE
A STARTCPQEPLRGTPGGALWLGVLRLLFKLLLFDLLTCSCLCDPAGPLPSATTTRLRALGS
HRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGRKPGSPVWGEGLSYLSSYPTCPAQAWCSRSAL
RAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA (SEQ ID NO:8).

15 La secuencia canónica de la región C de cadena alfa de TCR humana es:

PNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAV
AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVAGF
NLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:9).

20 La secuencia canónica de CTL-L17 de la región V de cadena alfa de TCR humana es:

MAMLLGASVLLWLQPDWVNSQQKNDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNMFDYFLWY
KKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSA VYFCAAKGAGTAKL
FTGTGTRLQVTL (SEQ ID NO:10).

La secuencia canónica de la región C de cadena beta de TCR humana es:

EDLNKVFPPPEAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTD PQLK
EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG
RADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF (SEQ ID NO:11).

La secuencia canónica de CTL-L17 de la región V de cadena beta de TCR humana es:

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPE
 FLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAPERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAGLNQPQHFGDGT
 RLSIL (SEQ ID NO:12).

La secuencia canónica de YT35 de la región V de cadena beta de TCR humana es:

LLIYFNNNVPIDDGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYFCASSFSTCSANYGYTFGSG
 TRLTVV (SEQ ID NO:13).

5 Generación de TFP a partir de dominios TCR y scFv

10 Se enlazan de forma recombinante los scFv de mesotelina a CD3-épsilon u otras subunidades TCR (véase 1C) mediante el uso de una secuencia enlazadora, tales como G₄S, (G₄S)₂ (G₄S)₃ o (G₄S)₄. Se usan diversos enlazadores y configuraciones de scFv. Se usaron las cadenas TCR alfa y TCR beta para la generación de TFP, ya sea como polipéptidos de longitud completa o únicamente sus dominios constantes. Se permite cualquier secuencia variable de cadenas TCR alfa y TCR beta para crear TFP.

15 **Vectores de expresión de TFP**

20 Se proporcionan vectores de expresión que incluyen: un promotor (promotor potenciador de citomegalovirus (CMV)), una secuencia de señal para permitir la secreción, una señal de poliadenilación y terminador de transcripción (gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH)), un elemento que permita la replicación episomal y la replicación en procariotas (por ejemplo, origen SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y elementos para permitir la selección (gen de resistencia a la ampicilina y marcador de zeocina).

25 Preferentemente, la construcción de ácido nucleico que codifica TFP se clona en un vector de expresión lentival y la expresión se valida basándose en la cantidad y calidad de la respuesta a linfocitos T efectores de linfocitos T transducidos con TFP.mesotelina (“mesotelina.TFP” o “linfocitos T mesotelina.TFP” o “TFP.mesotelina” o “linfocitos T TFP.mesotelina”) en respuesta a mesotelina + células objetivo. Las respuestas de linfocitos T efectores incluyen, de modo no taxativo, expansión celular, proliferación, duplicación, producción de citocina y lisis de células objetivo o actividad citolítica (es decir, desgranulación).

30 Los vectores de transferencia lentival TFP.mesotelina se usan para producir el material genómico empaquetado en las partículas lentivirales pseudotipadas VSV-G. Se mezcla ADN de vector de transferencia lentival con los tres componentes de empaquetado de VSV-G, gag/pol y rev combinados con reactivo Lipofectamine® para transfectarlos juntos en células HEK-293 (riñón embrionario, ATCC® CRL-1573™). Después de 24 y 48 horas, se recolecta el medio, se filtra y se concentra mediante ultracentrifugación. Se almacena la preparación vírica resultante a -80 °C. Se determina la cantidad de unidades de transducción mediante titulación en células Sup-T1 (linfoma linfoblástico de linfocitos T, ATCC® CRL-1942™) Los linfocitos T TFP.mesotelina redirigidos se producen mediante la activación de linfocitos T sin tratamiento nuevos con, por ejemplo, microesferas anti-CD3 anti-CD28 durante 24 h y después la adición de la cantidad adecuada de unidades de transducción para obtener el porcentaje deseado de linfocitos T transducidos. Se permite que estos linfocitos T modificados se expandan hasta que reposen y disminuyan de tamaño, momento en el cual se criopreservan para análisis posterior. Las cantidades y tamaños de células se miden mediante el uso de un Coulter Multisizer™ III. Antes de la criopreservación, se determina el porcentaje de células transducidas (que expresan TFP.mesotelina en la superficie celular) y la intensidad de fluorescencia relativa de esa expresión mediante análisis con citometría de flujo. A partir de las gráficas de histogramas, se examinan los niveles de expresión relativa de las TFP al comparar el porcentaje transducido con su intensidad fluorescente relativa.

45 45 En algunas modalidades, se introducen múltiples TFP mediante transducción de linfocitos T con múltiples vectores virales.

50 Evaluación de actividad citolítica, capacidades de proliferación y secreción de citocina de linfocitos T humanizados redirigidos con TFP

55 Se determinan las capacidades funcionales de los linfocitos T TFP.mesotelina para producir TFP expresadas en la superficie celular y para eliminar células tumorales objetivo, proliferar y secretar citocinas mediante el uso de ensayos conocidos en la técnica.

55 Se tratan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas (por ejemplo, sangre de un donante con aféresis normal cuyos linfocitos T sin tratamiento se obtienen mediante selección negativa para linfocitos T, linfocitos CD4+ y CD8+) con interleucina 2 humana (IL-2), después se activan con microesferas anti-CD3x anti-CD28, por ejemplo, en RPMI al 10 % a 37 °C, CO₂ al 5 % antes de la transducción con los vectores lentivirales que codifican

TFP. Se usan ensayos de citometría de flujo para confirmar la presencia en la superficie celular de una TFP, tal como mediante un anticuerpo anti-FLAG o un anticuerpo de dominio variable anti-murino. La producción de citocina (por ejemplo, IFN-γ) se mide mediante el uso de ELISA u otros ensayos.

5 **Ejemplo 3: Eficacia de linfocitos T TFP humanos en un modelo de ratón de LLA humana**

Es posible cultivar células de LLA humanas primarias en ratones inmunodeprimidos (por ejemplo, NSG o NOD) sin tener que cultivarlas *in vitro*. Asimismo, las líneas celulares de LLA humanas cultivadas pueden inducir la leucemia en tales ratones. Es posible usar los ratones que tienen LLA para evaluar la eficacia de linfocitos T humanos TFP.mesotelina, por ejemplo, en el modelo HALLX5447. La lectura en este modelo es la supervivencia de los ratones después de infusión intravenosa (i.v.) de células LLA en ausencia y en presencia de linfocitos T humanos TFP.mesotelina administrados por vía i.v.

10 **Ejemplo 4: Demostración de polipéptidos TFP multiplexados y uso de linfocitos T humanizados multiplexados y redirigidos con TFP**

15 Los polipéptidos TFP que se proporcionan en la presente son capaces de asociarse de forma funcional con polipéptidos de subunidades TCR endógenas para formar complejos TCR funcionales. Aquí, se usan múltiples TFP en vectores lentivirales para transducir linfocitos T para crear un complejo TCR recombinante funcional y multiplexado. 20 Por ejemplo, se proporciona un linfocito T que contiene i) una primera TFP que tiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular del polipéptido CD3-delta y un fragmento de anticuerpo scFv específico para mesotelina y ii) una segunda TFP que tiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular del polipéptido CD3-gamma y un fragmento de anticuerpo específico para mesotelina. La primera TFP y la segunda TFP son capaces de interactuar entre sí y con polipéptidos de subunidades de TCR endógenas, lo 25 que forma de este modo un complejo TCR funcional.

El uso de estos linfocitos T humanizados multiplexados TFP.mesotelina se puede demostrar en tumores líquidos y sólidos, tal como se proporcionan en los Ejemplos 2 y 3 anteriores.

30 **Ejemplo 5: Preparación de linfocitos T transducidos con TFP**

Producción lentiviral

35 Se preparan lentivirus que codifican las construcciones adecuadas de la siguiente manera. Se colocan 5×10^6 células HEK-293FT en una placa de 100 mm y se permite que alcancen 70-90 % de confluencia durante la noche. Se diluyen 2,5 µg de los plásmidos de ADN indicados y 20 µl de mezcla de empaquetamiento de lentivirus (ALSTEM, n.º de catálogo VP100) en 0,5 ml de DMEM o de medio Opti-MEM® I sin suero y se mezcla suavemente. En un tubo separado, se diluyen 30 µl de reactivo de transfección NanoFect® (ALSTEM, n.º de cat. NF100) en 0,5 ml de DMEM o de medio Opti-MEM® I sin suero y se mezcla suavemente. Se mezclan entonces las soluciones NanoFect/DMEM y 40 ADN/DMEM y se someten a vórtice durante 10-15 segundos antes de la incubación de la mezcla DMEM-plásmido-NanoFect a temperatura ambiente durante 15 minutos. El complejo de transfección completa de la etapa previa se agrega por goteo a la placa de células y se agita para dispersar el complejo de transfección de forma uniforme en la placa. Después se incuba la placa durante la noche a 37 °C en una incubadora humidificada de CO₂ al 5 %. Al día siguiente, se remplaza el sobrenadante con 10 ml de medio nuevo y se complementa con 20 µl de ViralBoost (500x, 45 ALSTEM, n.º de cat. VB100). Después se incuban las placas a 37 °C durante 24 horas adicionales. Después se recoge el sobrenadante que contiene lentivirus en un tubo centrífugo cónico estéril de 50 ml con tapa y se pone en hielo. Después de la centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se filtra el sobrenadante limpio con un filtro estéril de 0,45 µm con baja unión a proteínas y se aísla posteriormente un virus mediante ultracentrifugación a 25 000 rpm (Beckmann, L8-70M) durante 1,5 horas, a 4 °C. Se elimina el sedimento y se vuelve a suspender en medio DMEM y 50 se establecen las concentraciones/titulaciones de lentivirus mediante RT-PCR cuantitativa, mediante el uso del kit de titulación Lenti-X qRT-PCR (Clontech; número de catálogo 631235). Se elimina cualquier ADN plásmido residual mediante tratamiento con DNase. Se usa la preparación madre de virus para infección inmediatamente o se separa en alícuotas y se almacena a -80 °C para uso futuro.

55 **Aislamiento de PBMC**

Se preparan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre entera o la capa leucocitaria. Se recoge sangre entera en vacutainer de heparina de 10 ml y se procesa inmediatamente o se almacena durante la noche a 4 °C. Se mezclan aproximadamente 10 ml de sangre entera anticoagulada con solución amortiguadora salina amortiguada con fosfato (PBS) para un volumen total de 20 ml en un tubo de centrífuga cónico de 50 ml (PBS, pH 7,4, sin Ca²⁺/Mg²⁺). Después se superponen 20 ml esta mezcla de sangre/PBS cuidadosamente en la superficie de 15 ml de Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) antes de la centrifugación a 400 g durante 30-40 min a temperatura ambiente sin aplicación de pausas.

65 Se adquiere la capa leucocitaria de Research Blood Components (Boston, MA). Se preparan tubos LeucoSep® (Greiner bio-one) mediante la adición de 15 ml de Ficoll-Paque® (GE Health Care) y se centrifuga a 1000 g durante 1

minuto. Se diluye la capa leucocitaria 1:3 en PBS (pH 7,4, sin Ca^{2+} o Mg^{2+}). Se transfiere la capa leucocitaria diluida al tubo Leucosep y se centrifuga a 1000 g durante 15 minutos sin aplicación de pausas. La capa de células que contienen PBMC, que se observa en la interfaz de plasma diluido/ficoll, se elimina cuidadosamente para minimizar la contaminación por ficoll. Se eliminan entonces el ficoll, plaquetas y proteínas de plasma residuales mediante lavado de las PBMC tres veces con 40 ml de PBS mediante centrifugación a 200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Despues, se cuentan las células con un hemocitómetro. Se lavan las PBMC lavadas una vez con medio con CAR-T (AIM V-AlbuMAX® (BSA) (Life Technologies), con suero AB al 5 % y 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B (Gemini Bioproducts, Woodland, CA), 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina). De manera alternativa, se transfieren las PBMC lavadas a viales aislados y se congelan a -80 °C durante 24 horas antes de almacenarse en 10 nitrógeno líquido para uso posterior.

Activación de linfocitos T

15 PBMC preparadas ya sea a partir de sangre entera o capa leucocitaria se estimulan con microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpo anti-CD3 y CD28 humano durante 24 horas antes de la transducción viral. Las PBMC recién aisladas se lavan una vez en medio CAR-T (AIM V-AlbuMAX (BSA) (Life Technologies), con suero AB al 5 % y 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B (Gemini Bioproducts), 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina) sin hLL-2, antes de volver a suspenderlas a una concentración final de 1×10^6 células/ml en medio CAR-T con 300 IU/ml de IL-2 humana (de una solución madre 1000x; Invitrogen). Si las PBMC se habían congelado anteriormente, se dejan descongelar y se vuelven a suspender a 1×10^7 células/ml en 9 ml de medio cDMEM precalentado (37 °C) (Life Technologies), en presencia de FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina, a una concentración de 1×10^6 células/ml antes de lavarse una vez en un medio CART, volver a suspenderse a 1×10^6 células/ml en medio CAR-T y la adición de IL-2, tal como se describió anteriormente.

20 25 Antes de la activación, se lavan tres veces microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpo anti-CD28 y CD3 humano (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, Life Sciences) con 1 ml de PBS estéril 1x (pH7,4), mediante el uso de un bastidor magnético para aislar las microesferas de la solución, antes de volver a suspender en un medio CAR-T, con 300 IU/ml de IL-2 humana, hasta una concentración final de 4×10^7 microesferas/ml. Se mezclan después las PBMC y las microesferas a una proporción de microesfera con respecto a célula de 1:1, mediante transferencia de 25 30 μl (1×10^6 microesferas) de microesferas a 1 ml de PBMC. Después se dispensa la cantidad deseada de alícuotas a pocillos individuales de una placa de cultivo celular sin tratar o de poca unión de 12 pocillos y se incuba a 37 °C, con CO_2 al 5 %, durante 24 horas antes de la transducción viral.

Transducción/transfección de linfocitos T y expansión

35 40 45 50 55 Despues de la activación de las células PBMC, se incuban durante 48 horas a 37 °C, CO_2 al 5 %. Se descongela el lentivirus en hielo y se agregan 5×10^6 lentivirus, junto con 2 μl de TransPlus™ (Alstem) por ml de medio (una dilución final de 1:500) a cada pocillo de 1×10^6 células. Se incuban las células durante 24 horas adicionales antes de repetir la adición del virus. De manera alternativa, se descongela el lentivirus en hielo y se agrega el virus respectivo a 5 o 50 MOI en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno (Sigma). Se inoculan por centrifugación las células a 100 g durante 100 minutos a temperatura ambiente. Despues se cultivan las células en presencia continua de 300 IU/ml de IL-2 humana durante un período de 6-14 días (el tiempo total de incubación depende de la cantidad final de linfocitos T CAR necesaria). Se analizan las concentraciones celulares cada 2-3 días y se agrega medio en ese momento para mantener la suspensión celular a 1×10^6 células/ml.

En algunos casos, se electroporan PBMC activadas con ARNm transcripto *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés). En una modalidad, se estimulan PBMC humanas con Dynabeads® (ThermoFisher) a una proporción de 1 a 1 durante 3 días en presencia de 300 IU/ml de IL-2 recombinante humana (R&D Systems) (se pueden usar otros reactivos estimulantes, tales como el reactivo de linfocitos T TransAct de Milyeni Pharmaceuticals). Se eliminan las microesferas antes de la electroporación. Se lavan las células y se vuelven a suspender en un medio OPTI-MEM (ThermoFisher) a la concentración de $2,5 \times 10^7$ células/ml. Se transfieren 200 μl de la suspensión celular (5×10^6 células) a las cubetas de electroporación Plus™ con 2 mm de espacio (Harvard Apparatus BTX) y se preenfríen en hielo. Se agregan 10 μg de ARNm TFP IVT a la suspensión celular. La mezcla de ARNm/células se electropora después a 200 V durante 20 milisegundos mediante el uso de ECM830 Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX). Inmediatamente después de la electroporación, se transfieren las células a medio de cultivo celular nuevo (AIM V AlbuMAX (BSA) medio sin suero + suero AB humano al 5 % + 300 IU/ml de IL-2) y se incuban a 37 °C.

Verificación de la expresión de TFP mediante tinción celular

60 65 Despues de la transducción lentiviral o la electroporación de ARNm, se confirma la expresión de TFP anti-mesotelina mediante citometría de flujo, mediante el uso de un anticuerpo Fab anti-ratón para detectar el scFv murino anti-mesotelina. Se lavan los linfocitos T tres veces en 3 ml de amortiguador de tinción (PBS, BSA al 4 %) y se vuelven a suspender en PBS a 1×10^6 células por pocillo. Para la exclusión de células muertas, se incuban células con tinción de células muertas LIVE/DEAD® Fixable Aqua (Invitrogen) durante 30 minutos en hielo. Se lavan las células dos veces con PBS y se vuelven a suspender en 50 μl de amortiguador de tinción. Para bloquear los receptores de Fc, se agrega 1 μl de IgG de cabra normal (BD Bioscience) diluida 1:100 a cada tubo y se incuba en hielo durante 10 minutos. Se

- agrega 1,0 ml de amortiguador FACS a cada tubo, se mezcla bien y las células se sedimentan mediante centrifugación a 300 g durante 5 minutos. La expresión en la superficie de TFP de scFv se detecta mediante Fc de IgG1 de MSLN humana marcada con R-ficoeritrina Zenon® o control de isotipo de IgG1 humana. Se agrega 1 µg de anticuerpos a las muestras respectivas y se incuba durante 30 minutos en hielo. Las células se lavan después dos veces y se tiñen con marcadores de superficie mediante el uso de APC anti-CD3 (clon, UCYT1), anti-CD4-Pacific blue (clon RPA-T4), APCCy7 anti-CD8 (clon SK1) de BD bioscience. Se lleva a cabo una citometría de flujo mediante el uso de LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences) y se adquieren los datos mediante el uso del software Diva FACS y se analiza con FlowJo® (Treestar, Inc. Ashland, OR).
- 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Se muestran resultados ilustrativos en la FIG. 5A, que muestra el análisis de expresión en la superficie de células PBMC activadas teñidas para CD8 (APCCy7 anti-CD8, ejes y) y mesotelina ("MSLN") (IgG de hMSLN marcada con R-ficoeritrina Zenon®, ejes x). De izquierda a derecha se muestran células ya sea no transducidas o transducidas con construcciones anti-MSLN-CD3ε, anti-MSLN-CD28ζ y anti-MSLN-41BBζ. La proporción de células CD8+, MSLN+ se muestra en la esquina superior derecha de cada panel.
- La FIG. 5B muestra resultados similares a los de las células PBMC activadas teñidas para MSLN y GFP, que se transdujeron con construcciones de TFP que comprenden aglutinantes de mesotelina de dominio simple ("SD", por sus siglas en inglés) internos. La fila superior muestra (de izquierda a derecha) células no transducidas y células transducidas con un control positivo de TFP anti-MSLN-CD3ε ("SS1"). Las filas 2-4 muestran los aglutinantes anti-MSLN SD1, SD4 y SD6, respectivamente, en células transducidas con construcciones marcadas con GFP (de izquierda a derecha) de CD3ε TFP, CD3γTFP, TCRβ TFP y CD28ζ CAR. La proporción de células CFP+, MSLN+ se muestra en la esquina superior derecha de cada panel.
- Ejemplo 6: Ensayo de citotoxicidad mediante citometría de flujo**
- Se marcan las células objetivo que son positivas o negativas para mesotelina con el tinte fluorescente carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE). Estas células objetivo se mezclan con linfocitos T efectores que no se transdujeron, se transdujeron con construcciones CAR-T de control o se transdujeron con TFP. Después del período de incubación indicado, se determina el porcentaje de células objetivo marcadas con CFSE muertas respecto a las vivas y las células objetivo de control negativo para cada cultivo de células efectoras/objetivo mediante citometría de flujo. El porcentaje de supervivencia de células objetivo en cada cultivo de células objetivo positivas para linfocitos T se calcula con respecto a los pocillos que contienen únicamente células objetivo.
- Se mide la actividad citotóxica de los linfocitos T efectores al comparar la cantidad de células objetivo supervivientes en células objetivo con o sin linfocitos T efectores, seguido por la incubación conjunta de las células efectoras y objetivo mediante el uso de citometría de flujo. En experimentos con TFP mesotelina o linfocitos T CAR, las células objetivo son células positivas para mesotelina, mientras que las células usadas como control negativo son células negativas para mesotelina.
- Se lavan una vez las células objetivo y se vuelven a suspender en PBS a 1×10^6 células/ml. Se agrega el tinte fluorescente carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) (ThermoFisher) a la suspensión celular a una concentración de 0,03 µM y se incuban las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se detiene la reacción de marcado mediante la adición a la suspensión celular de medio de cultivo celular completo (RPMI-1640 + HI-FBS al 10 %) al volumen 5 veces el volumen de reacción y se incuban las células durante dos minutos adicionales a temperatura ambiente. Se sedimentan las células mediante centrifugación y se vuelven a suspender en medio de citotoxicidad (RPMI1640 sin rojo de fenol (Invitrogen) más suero AB al 5 % (Gemini Bioproducts) a 2×10^5 células/ml. Se agregan cincuenta microlitros de suspensión de células objetivo marcadas con CFSE (equivalente a 10 000 células) a cada pocillo de la placa de fondo en U de 96 pocillos (Corning).
- Se transducen los linfocitos T efectores con construcciones TFP anti-mesotelina, junto con linfocitos T no transducidos como controles negativos, se lavan y se suspenden a 2×10^6 células/ml, o 1×10^6 células/ml en medio de citotoxicidad. Se agregan 50 µl de suspensiones de linfocitos T efectores (equivalente a 100 000 o 50 000 células) a las células objetivo en placas para alcanzar la proporción de efectores con respecto a objetivo de 10 a 1 o de 5 a 1, respectivamente, en un volumen total de 100 µl. Despues se mezclan los cultivos, se centrifugan y se incuban durante cuatro horas a 37 °C y CO₂ al 5 %. Inmediatamente después de esta incubación, se agrega 7AAD (7-aminoactinomicina D) (BioLegend) a las células cultivadas tal como lo recomienda el fabricante y se lleva a cabo citometría de flujo con un BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences). Se lleva a cabo un análisis de los datos de citometría de flujo mediante el uso del software FlowJo® (TreeStar, Inc.).
- Se calcula el porcentaje de supervivencia para las células objetivo mediante la división de la cantidad de células objetivo vivas (CFSE+7-AAD-) en la muestra con linfocitos T efectores y células objetivo entre la cantidad de células vivas (CFSE+7-AAD-) en la muestra con células objetivo solas. Se calcula la citotoxicidad para las células efectoras como el porcentaje de eliminación para células objetivo = 100 % - porcentaje de supervivencia para las células.
- Los linfocitos T transducidos con una construcción CAR anti-MSLN 28ζ demostraron citotoxicidad contra células que expresan mesotelina, cuando se los compara con los linfocitos T que no se transducen o se transducen con un control

- CAR no específico para mesotelina. Sin embargo, los linfocitos T transducidos con anti-mesotelina-CD3 ϵ pueden inducir una citotoxicidad más eficiente contra los objetivos que el control CAR anti-mesotelina. Las TFP anti-mesotelina-CD3 γ también pueden mediar en una citotoxicidad potente que es mayor que la observada con CAR anti-mesotelina en las proporciones de efectora:objetivo de entre 5 y 10:1. Se puede observar cierta citotoxicidad con TFP anti-mesotelina-TCR α y anti-mesotelina-TCR β . Se pueden obtener resultados similares con TFP anti-mesotelina construidas con una región bisagra alternativa. Una vez más, la citotoxicidad contra células objetivo que expresan mesotelina es mayor con linfocitos T transducidos con TFP anti-mesotelina-CD3 ϵ o anti-mesotelina-CD3 γ que con linfocitos T transducidos con CAR anti-mesotelina.
- 5 10 Los linfocitos T electroporados con TFP que codifican ARNm específicos para mesotelina pueden demostrar también una citotoxicidad potente contra células que expresan mesotelina. Si bien no se puede observar una muerte significativa de células negativas para mesotelina ya sea con construcciones de TFP anti-mesotelina o de control, la muerte específica de mesotelina de células que expresan mesotelina se puede observar mediante linfocitos T transducidos ya sea con TFP anti-mesotelina-CD3 ϵ SL o anti-mesotelina-CD3 γ SL
- 15

Ejemplo 8: Determinación de la citotoxicidad mediante ensayo de citotoxicidad en tiempo real

- Las TFP anti-mesotelina también pueden demostrar una citotoxicidad superior con respecto a los CAR anti-mesotelina en el formato de ensayo de citotoxicidad en tiempo real (RTCA). El ensayo RTCA mide la impedancia eléctrica de una monocapa celular objetivo adherente en cada pocillo de una placa especializada de 96 pocillos, en tiempo real, y presenta la lectura final como un valor llamado índice celular. Los cambios en el índice celular indican alteraciones en la monolayer celular objetivo, producto de la eliminación de células objetivo mediante efectores de linfocitos T incubados de forma conjunta. Por tanto, la citotoxicidad de los linfocitos T efectores se puede evaluar como el cambio en el índice celular de los pocillos tanto con células objetivo como linfocitos T efectores, en comparación con el de los pocillos solamente con células objetivo.

- Se cultivan células objetivo adherentes en DMEM, FBS al 10 %, antibiótico-antimicótico al 1 % (Life Technologies). Para preparar RTCA, se agregan 50 μ l, por ejemplo, de medio DMEM en los pocillos adecuados de una placa E (ACEA Biosciences, Inc, n.º de catálogo: JL-10-156010-1A). Después se coloca la placa en un instrumento RTCA MP (ACEA Biosciences, Inc.) y se ingresa la disposición adecuada de placa y el programa del ensayo al software RTCA 2.0, tal como se describe en el manual de los fabricantes. Se llevan a cabo mediciones de referencia cada 15 minutos durante 100 mediciones. Después se agregan 1×10^4 células objetivo en un volumen de 100 μ l a cada pocillo de ensayo y se permite que las células se asienten durante 15 minutos. Se devuelve la placa al lector y se retoman las lecturas.
- 35 40 Al día siguiente, se lavan los linfocitos T y se vuelven a suspender en medios de citotoxicidad (RPMI1640 sin rojo de fenol (Invitrogen) más suero AB al 5 % (Gemini Bioproducts; 100-318)). Después se quita la placa del instrumento y los linfocitos T efectores, suspendidos en medio de citotoxicidad (RPMI1640 sin rojo de fenol + suero AB al 5 %), se agregan a cada pocillo a 100 000 células o 50 000 células para alcanzar la proporción de efecto con respecto a objetivo de 10 a 1 o 5 a 1, respectivamente. Después se coloca la placa nuevamente en el instrumento. Se lleva a cabo la medición cada 2 minutos durante 100 mediciones y luego cada 15 minutos durante 1000 mediciones.

- En el ensayo RTCA, se observó la muerte de células transducidas por mesotelina mediante linfocitos T transducidos con linfocitos T transducidos con CAR anti-mesotelina-28 ζ , tal como se demostró mediante una disminución dependiente del tiempo en el índice celular tras la adición de las células efectoras respecto a células solas o células coincubadas con linfocitos T transducidos con una construcción CAR de control. Sin embargo, la muerte de células objetivo mediante linfocitos T que expresan TFP anti-mesotelina-CD3 ϵ puede ser más profunda y más rápida que lo observado con el CAR anti-mesotelina. Por ejemplo, en las primeras 4 horas después de la adición de linfocitos T transducidos con TFP anti-mesotelina-CD3 ϵ , básicamente la muerte de las células objetivo que expresan mesotelina puede ser esencialmente completa. Se observa poca o nula muerte con los linfocitos T transducidos con una cantidad de construcciones TFP que comprenden otras construcciones de CD3 y TCR. Se pueden obtener resultados similares con TFP anti-mesotelina construidas con una región bisagra alternativa. La citotoxicidad contra células objetivo transducidas con mesotelina puede ser mayor con linfocitos T transducidos con TFP anti-mesotelina-CD3 ϵ o anti-mesotelina-CD3 γ que con linfocitos T transducidos con CAR anti-mesotelina.
- 45 50 55 60 65 La actividad citotóxica de los linfocitos T transducidos con TFP puede ser dependiente de la dosis con respecto a la cantidad de virus (MOI) usada para la transducción. El aumento de muerte de células positivas para mesotelina se puede observar con un aumento de MOI de lentivirus TFP anti-mesotelina-CD3 ϵ , lo que refuerza adicionalmente la relación entre la transducción por TFP y la actividad citotóxica.
- Se muestran resultados ilustrativos del ensayo de RTCA en la FIG. 6. Se puede modificar genéticamente una construcción de TFP anti-MSLN mediante clonación de un fragmento de ADN scFv anti-MSLN unido a un fragmento de ADN CD3 ϵ mediante una secuencia de ADN que codifica el enlazador: GGGGSGGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1) en un vector p510 (de SBI) en los sitios XbaI y EcoRI. La construcción de TFP anti-MSLN TFP generada fue p510_antiMSLN_SS1_CD3 ϵ (anti-MSLN SS1 scFv – enlazador- cadena CD3 ϵ humana).
- La mesotelina de longitud completa (NM_005823) se amplificó mediante PCR a partir de pCMV6_XL4_Mesothelin

(Origene) y se clonó en p527a digerido por restricción de EcoRI y XbaI (pCDH-EF1-MCS-T2A-Puro) (SBI) mediante reacción de recombinación de Gibson.

5 Las células objetivo para el RTCA eran células HeLa positivas para mesotelina (adenocarcinoma de cuello uterino, ATCC® CCL-2™) y se usaron células PC-3 negativas para mesotelina (adenocarcinoma de próstata, ATCC® CRL-1435™) como controles negativos. Se cultivaron células objetivo adherentes en DMEM con FBS al 10 % y antibiótico-antimicótico al 1 % (Life Technologies).

10 Se determinó el índice celular normalizado, que indica la citotoxicidad. Las PBMC eran no tratadas (traza n.º 1), no transducidas (traza n.º 2) o transducidas con vector vacío (traza n.º 3), una TFP anti-MSLN (“TRuC Anti-MSLN-CD3ε”, traza n.º 4), un CAR anti-MSLN con el dominio de señalización de CD28ζ (traza n.º 5) o 41BBζ (traza n.º 6) (“CAR Anti-MSLN-28ζ” y “CAR Anti-MSLN-41BBζ”, respectivamente).

15 Tal como se muestra en la FIG. 6A, las células HeLa positivas para MSLN objetivo fueron destruidas de manera eficaz mediante los linfocitos T transducidos con TFP anti-MSLN, en comparación con los controles negativos. En contraste, las células PC-3 negativas para MSLN no fueron destruidas de manera eficaz por ninguna de las construcciones (FIG. 6B).

20 Se realizó un experimento similar mediante el uso de construcciones de TFP interna con aglutinantes anti-mesotelina de dominio simple. La FIG. 6C muestra la destrucción de células positivas para MSLN en una línea celular de densidad objetivo elevada (HeLa-(MSLN^{alta})) mediante el uso de linfocitos T a partir de dos donantes humanos diferentes (superior e inferior). Se muestran las trazas de muerte celular para linfocitos T TFP con los aglutinantes anti-MSLN SD1 (izquierda), SD4 (centro) y SD6 (derecha). Las PBMC activadas eran no transducidas (traza n.º 1) o transducidas con CD3ε TFP (traza n.º 2), CD3γ TFP (traza n.º 3), TCRβ TFP (traza n.º 4) o CD28ζ CAR (traza n.º 5). Se determinó el índice celular normalizado, que indica la citotoxicidad, en un ensayo de analizador celular en tiempo real (RTCA, por sus siglas en inglés). Tal como se muestra en la Figura, todos los linfocitos T, excepto los no transducidos, fueron capaces de destruir células cancerosas.

Ejemplo 7: Ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa en células con densidad objetivo elevada o baja

30 El ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa (ensayo “Luc-Cito”) evalúa la citotoxicidad de linfocitos T CAR y T TFP mediante la medición indirecta de la actividad enzimática de luciferasa en las células objetivo vivas residuales después del cocultivo. Las células de densidad objetivo elevada usadas en el ensayo Luc-Cito eran células HeLa-MSLN^{alta} y las células de densidad objetivo baja usadas eran células PC3 que expresaban niveles bajos de mesotelina (PC3-MSLN^{baja}), cada una transducida para expresar luciferasa de luciérnaga. El ADN que codifica luciferasa de luciérnaga se sintetizó mediante GeneArt® (Thermo Fisher®) y se insertó en el sitio de clonación múltiple del vector lentiviral de promotor simple pCDH527A-1 (System Bioscience).

40 El lentivirus que portaba la luciferasa de luciérnaga se empaquetó de la forma descrita anteriormente. Las células HeLa-MSLN^{alta} o PC3-MSLN^{baja} se transdijeron con el lentivirus que portaba la construcción de luciferasa de luciérnaga durante 24 horas y después se seleccionó con puromicina (5 µg/ml). La generación de células de luciferasa de HeLa-luc-MSLN^{alta} y PC3-luc-MSLN^{baja} se confirmó al medir la actividad enzimática de luciferasa en las células mediante el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega).

45 Poblaciones separadas de dos donantes humanos diferentes se transdijeron con un vector de expresión vacío (“NT”) o las siguientes TFP o CAR: anti-MSLN (control positivo, “SS1”, afinidad 11nM), anti-MSLN-SD1 (afinidad 25 nM), anti-MSLN-SD4 (afinidad 6 nM) o anti-MSLN SD6 (afinidad 0,59 nM), cada uno en el formato de TFP CD3ε, TFP CD3γ, TFP TCRβ y CAR CD28ζ. Las dos poblaciones de linfocitos T transducidos se incubaron con HeLa-MSLN^{alta} (FIG. 7) o PC3-MSLN^{baja} (FIG. 8).

50 Las células objetivo se colocaron en placas a 5000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Los linfocitos T TFP, T CAR y de control se agregaron a las células objetivo a proporciones de efectora a objetivo de 1:1 (barras negras) o 1:5 (barras grises). La mezcla de células se cultivó entonces durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 % antes de medir la actividad enzimática de luciferasa en las células objetivo vivas mediante el sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo®. Las células se centrifugaron para obtener un sedimento y se volvieron a suspender en medio que contenía el sustrato de luciferasa. La luciferasa se liberó mediante lisis celular, por lo tanto, una actividad de luciferasa mayor corresponde a un mayor porcentaje de muerte celular.

60 Los resultados mediante el uso de niveles altos de expresión celular de MSLN se muestran en la FIG. 7. Se muestran los % de células en muestras sin linfocitos T (“solamente objetivo”), transducidas con vector vacío (“NT”), anti-MSLN (control positivo, “SS1”) o linfocitos T de TFP anti-mesotelina con aglutinantes anti-mesotelina internos SD1 (FIG. 7A), SD4 (FIG. 7B) y SD6 (FIG. 7C), cada uno en el formato de CD3ε TFP, CD3γ TFP, TCRβ TFP y CD28ζ CAR. En cada gráfica, las barras negras representan una relación 1:1 de linfocitos T con respecto a las células objetivo y las barras grises representan una relación 1:5 de linfocitos T con respecto a las células objetivo. Como puede observarse en las Figuras, todos los linfocitos T TFP, linfocitos T CAR y SS1 de control positivo fueron eficaces para destruir la MSLN.

La **FIG. 8** es una serie de gráficas que muestra la actividad de linfocitos T CAR anti-MSLN y linfocitos T de TFP contra una línea celular objetivo que expresa niveles bajos de mesotelina (PC3-MSLN^{baja}). Se muestran los % de células en muestras sin linfocitos T ("solamente objetivo"), transducidas con vector vacío ("NT"), anti-MSLN (control positivo, "SS1") construcciones anti-mesotelina SD1, SD4 y SD6 en los formatos de TFP CD3ε (FIG. 8A), CD3γ (FIG. 8B),

5 TCRβ (FIG. 8C) y CD28ζ CAR (FIG. 8D). En cada gráfica, las barras negras representan una relación 1:1 de linfocitos T con respecto a las células objetivo y las barras grises representan una relación 1:5 de linfocitos T con respecto a las células objetivo. Se observaron resultados similares para un segundo donante de linfocitos T.

10 Como se observa en la FIG., una proporción de 1:1 de linfocitos T con respecto a las células objetivo dio como resultado el nivel más alto de muerte de células objetivo, como se esperaba. Además, todos los linfocitos T TFP y linfocitos T CAR mostraron una actividad similar en células que expresan niveles elevados de MSLN.

Ejemplo 8: Medición de la activación de linfocitos T mediante FACS

15 La activación de linfocitos T que expresan construcciones de TFP y CAR anti-mesotelina se realizó mediante el uso de células K562 MSLN+ y MSLN- y como se muestra en la FIG. 9. Como se describió anteriormente, las PBMC activadas se transdijeron con 50 MOI LV durante dos días consecutivos y se expandieron. En el día 8 después de la transducción, los cocultivos de PBMC se establecieron con células objetivo (células K562 que sobreexpresan MSLN) a una proporción E:T 1:1 ((0,2 x 10⁶ de cada tipo celular) en medio de citotoxicidad (RPMI1640 sin rojo de fenol 20 (Invitrogen) más suero AB al 5% (Gemini Bioproducts; 100-318). Se usaron células K562 que sobreexpresan BCMA como controles negativos. 24 horas después del comienzo del cocultivo, las células se recogieron, se lavaron con PBS tres veces y se tiñeron con Live/Dead Aqua durante 30 minutos en hielo. Para bloquear los receptores de Fc, se agregó un bloque de Fc humano (BD) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se tiñeron posteriormente con anti-CD3 APC (clon, UCHT1), APCcy7 anti-CD8 (Clon SK1), anti-CD69-Alexa Fluor® 700 (clon 25 FN50) de BD Biosciences y anti-CD25-PE (Clon BC96, eBioscience). Las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante BD LSRII-Fortessa. Los datos se analizaron como se muestra anteriormente mediante el uso del software de análisis FlowJo® (Tree star, Inc.).

30 Tal como se muestra en la FIG. 9A, de izquierda a derecha, los linfocitos T no se transdijeron, se transdijeron con vector vacío, se transdijeron con TFP anti-MSLN-CD3ε, CAR anti-MSLN-28ζ o CAR anti-MSLN-41BBζ. Las células cocultivadas con células MSLN- se muestran en la fila superior y las cocultivadas con células objetivo MSLN+ se muestran en la fila inferior. Las células se tiñeron entonces con anticuerpos específicos para los marcadores de activación en la superficie CD69 y CD25. Las cantidades de células teñidas con anti-CD69 corresponde a los ejes x y las teñidas con anti-CD25 corresponde a los ejes y. Como se muestra, los linfocitos T que expresan las construcciones 35 de CAR y TFP anti-mesotelina se activaron mediante el cultivo con células MSLN+, según lo demuestran los niveles elevados de expresión de CD69 y CD25, en relación con el cocultivo con células MSLN- (FIG. 9B). Se muestra el porcentaje de células CD25+ para cada construcción en MSLN- (barras blancas) y MSLN+ (barras negras).

40 Un experimento similar se realizó mediante el uso de células K562 MSLN- (FIG. 9C, círculos) y células K562-MSLN+ (FIG. 9C, cuadrados) ya sea en linfocitos T no transducidos o linfocitos T transducidos con aglutinantes de control positivos anti-MSLN ("510-SS1-CD3ε). Los datos representan la suma de células CD25+, CD69+ y CD25+/CD69+. En la FIG. 9D, se muestran datos para los aglutinantes anti-MSLN internos SD1 (cuadrados), SD4 (círculos) y SD6 (triángulos) en células objetivo K562 MSLN- (panel izquierdo) y células K562 MSLN+ (panel derecho) combinadas con linfocitos T donantes que tienen formatos de TFP CD3ε, CD3γ, TCRβ y CD28ζ CAR. Se observaron resultados similares mediante el uso de un segundo donante de linfocitos T.

50 La activación de linfocitos T puede evaluarse de manera similar mediante análisis de producción de granzima B. Los linfocitos T se cultivan y expanden como se describió anteriormente y la tinción intracelular para granzima B se realiza de acuerdo con las instrucciones del kit del fabricante (Gemini Bioproducts; 100-318). Las células se recogieron, se lavaron con PBS tres veces y se bloquearon con bloque de Fc humano durante 10 minutos. Las células se tiñeron para detectar antígenos de superficie con APC anti-CD3 (clon, UCHT1) y APCcy7 anti-CD8 (Clon SK1) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se fijaron después con solución de fijación/permeabilización (kit de fijación/permeabilización BD Cytofix/Cytoperm n.º de cat. 554714) durante 20 minutos a 4 °C, seguido por lavado con amortiguador de lavado/BD Perm. Las células se tiñeron posteriormente con Alexafluor700 anti-granzima B (clon 55 GB11), se lavaron con amortiguador de lavado/BD Perm dos veces y se volvieron a suspender en amortiguador de FACS. Los datos se adquirieron en BD LSRII-Fortessa y se analizaron mediante el uso de FlowJo® (Tree star Inc.).

60 Tal como se muestra en la FIG. 10A, de izquierda a derecha, los linfocitos T no se transdijeron, se transdijeron con vector vacío, se transdijeron con TFP anti-MSLN-CD3ε, CAR anti-MSLN-28ζ o CAR anti-MSLN-41BBζ. Las células cocultivadas con células MSLN- se muestran en la fila superior y las cocultivadas con células objetivo MSLN+ se muestran en la fila inferior. Las cantidades de células teñidas con anti-GrB corresponden a los ejes x y las teñidas con anti-CD8 corresponden a los ejes y. Como se muestra, los linfocitos T que expresan construcciones de TFP y CAR anti-mesotelina se activaron mediante el cultivo con células MSLN+ pero no las células MSLN-. Estos resultados se muestran nuevamente en la FIG. 10B, donde se muestra el porcentaje de células GrB+ para cada construcción en células negativas para mesotelina ("MSLN-", barras blancas) y positivas para mesotelina ("MSLN+", barras negras). Estos datos demuestran la capacidad de las células que expresan MSLN para activar específicamente linfocitos T.

Ejemplo 9: Secreción de IL-2 e IFN-γ mediante ELISA

- Otra medida de la activación de linfocitos T efectores asociada con el reconocimiento de células que portan el antígeno afín es la producción de citocinas efectoras, tales como la interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN-γ).
- Se llevan a cabo ensayos ELISA para detectar IL-2 humana (n.º de catálogo EH2IL2, Thermo Scientific) e IFN-γ n.º de catálogo KHC4012, Invitrogen) tal como se describe en los prospectos de los productos. En un ejemplo, se agregan 50 µl de muestras o estándares reconstituidos por duplicado a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, seguido por 50 µl de reactivo de anticuerpo biotinilado. Se mezclan las muestras mediante golpeteo suave de la placa varias veces. Despues se agregan 50 µl de diluyente estándar a todos los pocillos que no contienen muestras o estándares y se sella cuidadosamente la placa con una cubierta de placa adhesiva antes de la incubación durante 3 horas a temperatura ambiente (20-25 °C). Despues se quita la cubierta de placa, se vacía el contenido de la placa y se rellena cada pocillo con amortiguador de lavado. Este procedimiento de lavado se repite un total de 3 veces y se transfiere la placa en toallas de papel u otro material absorbente. Se agregan 100 µl de solución de estreptavidina-HRP preparada a cada pocillo y se fija una nueva cubierta de placa antes de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Despues se vuelve a quitar la cubierta de la placa, se descarta el contenido de la placa y se agregan 100 µl de solución de sustrato TMB en cada pocillo. Se permite que la reacción se desarrolle a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos, despues de lo cual se agregan 100 µl de solución de cese de reacción en cada pocillo. Evaluación de la placa. Se mide la absorbancia en un lector de placas ELISA establecido a 450 nm y 550 nm en los primeros 30 minutos del cese de la reacción. Se restan valores de 550 nm de los valores de 450 nm y se calculan las cantidades de IL-2 en muestras desconocidas con respecto a los valores obtenidos de una curva estándar de IL-2.
- De manera alternativa, se llevan a cabo ensayos 2 Plex mediante el uso del kit de reactivo amortiguador magnético de citocina humana (Invitrogen, LHB0001M) con el kit de microesferas magnéticas para IL-2 humana (Invitrogen, LHC0021M) y el kit de microesferas magnéticas para IFN-γ humano (Invitrogen, LHC4031M). Brevemente, se agregan 25 µl de microesferas de anticuerpos para IL-2 e IFN-γ humanos a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se lava mediante el uso de las siguientes pautas: dos lavados de 200 µl 1x con solución de lavado, colocar la placa en contacto con un separador magnético de placas de 96 pocillos (Invitrogen, A14179), permitir que las microesferas se asienten durante 1 minuto y decantar el líquido. Entonces, se agregan 50 µl de amortiguador de incubación a cada pocillo de la placa con 100 µl de estándares reconstituidos por duplicado o 50 µl de muestras (sobrenadantes de ensayos de citotoxicidad) y 50 µl de diluyente de ensayo, por triplicado, para un volumen total de 150 µl. Se mezclan las muestras en la oscuridad a 600 rpm con un agitador orbital con un radio de órbita de 3 mm durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lava la placa siguiendo las mismas pautas de lavado y se agregan 100 µl de anticuerpo detector biotinilado con IL-2 e IFN-γ a cada pocillo. Se mezclan las muestras en la oscuridad a 600 rpm con un agitador orbital con un radio de órbita de 3 mm durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava la placa siguiendo las mismas pautas de lavado y se agregan 100 µl de estreptavidina-R-ficoeritrina a cada pocillo. Se mezclan las muestras en la oscuridad a 600 rpm con un agitador orbital con un radio de órbita de 3 mm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lava la placa 3 veces mediante el uso de las mismas pautas de lavado y despues de decantar el líquido, se vuelven a suspender las muestras en 150 µl de solución de lavado 1x. Se mezclan las muestras a 600 rpm con un agitador orbital con un radio de órbita de 3 mm durante 3 minutos y se almacena durante la noche a 4 °C. A continuación, se lava la placa siguiendo las mismas pautas de lavado y se vuelven a suspender las muestras en 150 µl de solución de lavado 1x.
- Se lee la placa mediante el uso del sistema MAGPIX (Luminex) y el software xPONENT. Se lleva a cabo el análisis de los datos mediante el uso del software MILLIPLEX Analyst, que proporciona las concentraciones de citocina y la curva estándar.
- Con respecto a los linfocitos T transducidos con CAR de control o no transducidos, los linfocitos T transducidos con TFP anti-mesotelina pueden producir niveles mayores tanto de IL-2 como de IFN-γ cuando se cultivan junto con células que expresan de forma endógena mesotelina o células transducidas con mesotelina. En contraste, el cultivo conjunto con células negativas para mesotelina o células no transducidas puede producir poca liberación de citocina, o no la produce, a partir de los linfocitos T transducidos con TFP. De forma coherente con los datos de citotoxicidad previos, las TFP anti-mesotelina construidas con una región bisagra alternativa pueden generar resultados similares tras el cultivo conjunto con células objetivo que portan mesotelina.
- De acuerdo con los datos de citotoxicidad previos, anti-mesotelina-CD3ε y anti-mesotelina-CD3γ pueden producir los niveles de IL-2 e IFN-γ más altos de las construcciones de TFP. Sin embargo, la producción de citocina mediante linfocitos T transducidos con TFP anti-mesotelina-CD3ε y anti-mesotelina-CD3γ fue similar a aquella de los linfocitos T que expresan CAR anti-mesotelina-28ζ, a pesar de que las TFP demostraron niveles mucho mayores de destrucción de células objetivo. La posibilidad de que las TFP puedan eliminar de forma más eficaz las células objetivo que CAR, pero que liberen niveles comparables o menores de citocinas proinflamatorias, representa una posible ventaja para las TFP respecto a CAR, ya que los niveles elevados de estas citocinas se han asociado con las toxicidades limitantes de las dosis para las terapias adoptivas con CAR-T.
- Se muestran resultados ilustrativos en la FIG. 11. Como se describió anteriormente, las PBMC activadas se

transdujeron con 50 MOI de lentivirus durante dos días consecutivos y se expandieron. En el día 8 después de la transducción, los cocultivos de PBMC se establecieron con células objetivo (células K562 que sobreexpresan MSLN) a una proporción E:T 1:1 (0,2 x 10⁶ de cada tipo celular) en medio de citotoxicidad (RPMI1640 sin rojo de fenol (Invitrogen) más suero AB al 5 % (Gemini Bioproducts; 100-318). Se usaron células K562 que sobreexpresan BCMA como controles negativos. Despues de 24 horas, las células se analizaron para detectar la expresión de IFN-γ (FIG. 11A) e IL-2 (FIG. 11B) mediante ELISA como se describió anteriormente. En cada FIG., de izquierda a derecha, los linfocitos T no se transdujeron, se transdujeron con vector vacío, se transdujeron con TFP anti-MSLN-CD3ε, CAR anti-MSLN-28ζ o CAR anti-MSLN-41BBζ. Las células cocultivadas con células MSLN- se representan mediante barras blancas, y las cocultivadas con células objetivo MSLN+ se representan mediante barras negras. Como puede observarse en la FIG., los linfocitos T que expresan las construcciones de TFP y CAR anti-mesotelina se activaron, como se evidencia por la producción de IFN-γ e IL-2, mediante el cocultivo con células MSLN+ pero no las células MSLN-, lo que demuestra de manera adicional la capacidad de las células que expresan MSLN para activar específicamente linfocitos T.

15 Ejemplo 10: Exposición de CD107a mediante citometría de flujo

Un ensayo adicional para la activación de linfocitos T es la expresión superficial de CD107a, una proteína de membrana asociada al lisosoma (también conocida como LAMP-1) que se ubica en la membrana de los gránulos citolíticos citoplasmáticos en células en reposo. La desgranulación de los linfocitos T efectores, un requisito previo para la actividad citolítica, produce la movilización de CD107a a la superficie celular, después de la exocitosis de gránulos inducida por activación. Por tanto, la exposición de CD107a proporciona una medida adicional de la activación de linfocitos T, además de la producción de citocina, que se correlaciona fuertemente con la citotoxicidad.

25 Se lavan las células objetivo y efectoras por separado y se vuelven a suspender en medio de citotoxicidad (RPMI+ suero AB humano al 5 % + antibiótico antimicótico al 1 %). Se lleva a cabo el ensayo mediante la combinación de 2x10⁵ células efectoras con 2x10⁵ células objetivo en un volumen final de 100 µl en placas con fondo en U de 96 pocillos (Corning), en presencia de 0,5 µl/pocillo de anticuerpo anti-CD107a humano (LAMP-1) marcado con PE/Cy7 (Clon H4A3, BD Biosciences). Despues se incuban los cultivos durante una hora a 37 °C, CO₂ al 5 %. Inmediatamente después de esta incubación, se agregan cuidadosamente 10 µl de una dilución 1:10 del inhibidor de secreción 30 monensina (solución 1000x, BD GolgiStop™) a cada pocillo sin alterar las células. Despues se incuban las placas durante 2,5 horas adicionales a 37 °C, CO₂ al 5 %. Despues de esta incubación, se tiñen las células con anticuerpo CD3 APC anti-humano (Clon UCHT1, BD Biosciences), anticuerpo PerCP/Cy5.5 anti-CD8 humano (Clon SK1, BD Biosciences) y anticuerpo Pacific Blue anti-CD4 humano (Clon RPA-T4, BD Biosciences) y luego se incubó durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 %. A continuación se lavan las células 2x con amortiguador FACS (y se vuelven a suspender en 100 µl de amortiguador FACS y 100 µl de amortiguador IC fix antes del análisis).

40 Se detecta la exposición de CD107a en la superficie de linfocitos T mediante citometría de flujo. Se lleva a cabo una citometría de flujo con un LSRII Fortessa™ X20 (BD Biosciences) y se lleva a cabo el análisis de los datos de citometría de flujo mediante el uso del software FlowJo (Treestar, Inc. Ashland, OR). Se determina el porcentaje de linfocitos T efectores CD8+, dentro de la selección CD3, que son positivos para CD107 para cada cultivo de células efectoras/objetivo.

45 De forma coherente con los datos de citotoxicidad y citocinas anteriores, el cultivo conjunto de células objetivo que expresan mesotelina con linfocitos T efectores transducidos con CAR anti-mesotelina-28ζ puede inducir un aumento en la expresión de CD107a en la superficie respecto a las efectoras incubadas con células objetivo negativas para mesotelina. En comparación, en las mismas condiciones, las efectoras que expresan TFP anti-mesotelina-CD3ε LL o anti-mesotelina-CD3y LL pueden presentar una inducción de 5 a 7 veces de la expresión de CD107a. Las TFP anti-mesotelina construidas con una región bisagra alternativa pueden generar resultados similares tras el cocultivo con células objetivo que portan mesotelina.

50 Ejemplo 11: Estudios de eficacia en ratones *in vivo*

55 Para evaluar la capacidad de los linfocitos T efectores transducidos con TFP anti-mesotelina de lograr respuestas antitumorales *in vivo*, se transfieren de manera adoptiva linfocitos T efectores con CAR anti-mesotelina-28ζ, TFP anti-mesotelina-CD3ε LL o TFP anti-mesotelina-CD3y LL en ratones NOD/SCID/IL-2Ry/- (NSG-JAX) que habían sido inoculados previamente con líneas celulares de cáncer humano mesotelina+.

60 Se obtienen ratones hembra NOD/SCID/IL-2Ry/- (NSG-JAX), al menos de 6 semanas, antes del inicio del estudio de Jackson Laboratory (número de inventario 005557) y se aclimatan durante 3 días antes del uso experimental. Las líneas celulares que expresan mesotelina humana para inoculación se mantienen en cultivo de fase logarítmica antes de la recolección y el recuento con azul de tripano para determinar un recuento celular viable. El día de exposición tumoral, se centrifugan las células a 300 g durante 5 minutos y se vuelven a suspender en PBS estéril precalentado a 0,5-1x10⁶ células/100 µl. Se preparan linfocitos T para transferencia adoptiva, ya sea no transducidos o transducidos con construcciones de CAR anti-mesotelina-28ζ, TFP anti-mesotelina-CD3ε LL o TFP anti-CD3y LL. El día 0 del estudio, se exponen a 10 animales por grupo experimental de forma intravenosa con 0,5-1x10⁶ células que expresan mesotelina. 3 días después, se transfieren de forma intravenosa 5x10⁶ de las poblaciones de linfocitos T efectores a

cada animal en 100 μ l de PBS estéril. Se registran diariamente observaciones clínicas detalladas en los animales hasta la eutanasia. Se toman mediciones del peso corporal a todos los animales semanalmente hasta la muerte o eutanasia. Se practica la eutanasia a todos los animales 35 días después de la transferencia adoptiva de los artículos de ensayo y de control. Se practica la eutanasia a todo animal que pareciera moribundo durante el estudio a criterio del director del estudio, consultando con un veterinario.

En relación a los linfocitos T no transducidos, la transferencia adoptiva de linfocitos T transducidos con CAR anti-mesotelina-28 ζ CAR, TFP anti-mesotelina-CD3 ϵ LL o TFP anti-mesotelina-CD3 γ LL puede prolongar la supervivencia de ratones que portan un tumor de línea celular que expresa mesotelina y puede indicar que tanto los linfocitos T transducidos con CAR como los transducidos con TFP anti-mesotelina son capaces de mediar en la muerte de células objetivo con un correspondiente aumento de supervivencia en estos modelos de ratón. De forma conjunta, estos datos pueden indicar que las TFP representan una plataforma alternativa para la modificación de receptores químicos que demuestren una eliminación superior específica para un antígeno respecto a CAR de primera generación, tanto *in vitro* como *in vivo*.

15 Ejemplo 12: Tratamiento con linfocitos T TFP humanos en un modelo de ratón con xenoinjerto de tumor sólido *in vivo*

La eficacia del tratamiento con linfocitos T humanos TFP.mesotelina se puede evaluar también en modelos de ratón con inmunosupresión que tienen tumores sólidos subcutáneos derivados de líneas celulares humanas de ALL, CLL, NHL o MSTO que expresan mesotelina. El encogimiento tumoral como respuesta al tratamiento con linfocitos T humanos TFP.mesotelina puede evaluarse ya sea mediante medición con calibrador de tamaño tumoral o mediante el seguimiento de la intensidad de una señal de proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) emitida por células tumorales que expresan GFP.

25 Las células de tumores sólidos humanas primarias se pueden cultivar en ratones inmunodeprimidos sin tener que cultivarlas *in vitro*. Los ejemplos de células de cánceres sólidos incluyen líneas celulares de tumores sólidos, tales como las que se proporcionan en The Cancer Genome Atlas (TCGA) y/o la Broad Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE, véase Barretina *et al.*, *Nature* 483:603 (2012)). Los ejemplos de células de cánceres sólidos incluyen células tumorales primarias aisladas de mesotelioma, carcinoma de células renales, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer cerebral, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, endometrio o estómago. En algunas modalidades, el cáncer que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en mesoteliomas, adenocarcinomas de ovario serosos papilares, carcinomas de ovario de células claras, carcinomas de ovario müllerianos mixtos, carcinomas de ovario mucinosos endometrioides, adenocarcinomas de páncreas, adenocarcinomas de páncreas ductales, carcinomas serosos uterinos, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas del conducto biliar extrahepático, adenocarcinomas gástricos, adenocarcinomas de esófago, adenocarcinomas colorrectales y adenocarcinomas de mama. Es posible usar estos ratones para evaluar la eficacia de los linfocitos T TFP.mesotelina en los modelos de xenoinjerto de tumores humanos (véase, por ejemplo, Morton *et al.*, *Nat. Procol.* 2:247 (2007)). Despues de un implante o inyección de 1×10^6 - 1×10^7 células primarias (suspensiones tumorales en volumen tratadas con colagenasa en material de matriz EC) o fragmentos tumorales (fragmentos de tumores primarios en material de matriz EC) de forma subcutánea, se permite que los tumores crezcan a 200-500 mm^3 antes del inicio del tratamiento.

45 Uno de tales experimentos se realizó para evaluar la eficacia de la actividad de anticuerpo de dominio simple (sdAb) específico de MSLN *in vivo* en un modelo de ratón de xenoinjerto de mesotelioma como se describió anteriormente. Se inocularon 1×10^6 células por ratón de MSTO-211H-FL-MSLN-Luc) marcado con luciferasa por vía subcutánea, a una proporción 1:1 con Matrigel®. El volumen tumoral se supervisó mediante medición con calibre dos veces por semana. Catorce días después de la inyección tumoral, cuando el volumen tumoral era aproximadamente 300 mm^3 , se inyectaron 1×10^7 linfocitos T por vía intravenosa en cada animal. Los linfocitos T incluían aquellos transducidos con TFP CD3 ϵ -SD1, una TFP CD3 γ -SD1, una TFP CD3 ϵ -SD4, una TFP CD3 γ -SD4, un CAR CD28 ζ SD1 y un CAR CD28 ζ SD1. Se usó un grupo de ratones sin inyección de linfocitos T como control negativo.

55 Los resultados se muestran en la FIG. 12A. Los ratones a los que se les inyectó linfocitos T TFP CD3 ϵ -SD1 y TFP CD3 γ -SD1 presentaron una reducción mayor y más rápida en el volumen tumoral, aunque los ratones a los que se les inyectó cualquiera menos el control sin linfocitos T presentaron reducciones del volumen tumoral después de la inyección de los linfocitos T.

60 La eficacia persistente de los linfocitos T ϵ - y γ -TFP SD1 se evaluó *in vivo* mediante una nueva exposición de los ratones supervivientes en el modelo de ratón de xenoinjerto de mesotelioma.

65 A los ratones se los inoculó con 1×10^6 células tumorales (MSTO 211H FL MSLN Luc) por ratón por vía subcutánea con Matrigel® (proporción 1 a 1). A un grupo de ratones se le inyectaron células Raji como control negativo y a un grupo de ratones se le inyectaron células MSTO solas, nuevamente como control negativo. El volumen tumoral se supervisó mediante medición con calibre dos veces por semana. Catorce días después de la inyección tumoral, cuando el volumen tumoral alcanzó aproximadamente 300 mm^3 , se inyectaron 1×10^7 MSTO (MSLN+) o Raji (MSLN-, como control negativo) por vía intravenosa en cada animal. Los resultados se muestran en la FIG. 12B. Cada línea en la

figura representa un único animal. Como se muestra en la FIG., los ratones que fueron tratados previamente con linfocitos T TFP anti-MSLN fueron capaces nuevamente de reducir el volumen tumoral o erradicar el tumor, lo cual indica que los linfocitos T inyectados originalmente persistían en el animal o que los ratones habían desarrollado una respuesta de memoria anti-MSLN. En contraste, los ratones que se volvieron a exponer con células Raji (MSLN-) no fueron capaces de controlar el crecimiento de los tumores de Raji, mediante lo cual se ilustra la especificidad de la respuesta de linfocitos T TFP.

Ejemplo 13. Eficacia *in vivo* de linfocitos T ϵ -TFP MSLN derivados de pacientes en modelo de ratón de xenoinjerto de tumor de MSLN

Se usaron linfocitos T ϵ -TFP SD1 de pacientes con cáncer de ovario para evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de linfocitos T ϵ -TFP SD1 contra células tumorales que expresan mesotelina (MSTO-MSLN-Luc).

Se preparó lentivirus de la forma descrita anteriormente.

Preparación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a partir de sangre entera de pacientes con cáncer de ovario

Se purificaron linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a partir de sangre entera de pacientes con cáncer de ovario de la siguiente manera (se muestra un resumen esquemático en la FIG. 13A). Se recogieron 40-50 ml de sangre entera heparinizada de pacientes con cáncer de ovario y se envió durante la noche por Conversant Bio (Huntsville, Alabama). La sangre se diluyó con volumen igual de PBS y 35 ml de sangre entera diluida se colocaron cuidadosamente sobre 15 ml de Ficoll-Paque® (GE healthcare, n.º de cat.: 17-5442-02) en un tubo cónico de 50 ml. Se centrifugó entonces a 800 \times g durante 20 minutos a TA en una centrífuga de rotor giratorio sin pausas. La capa superior se aspiró, lo cual dejó una capa de células mononucleares (linfocitos, monocitos y trombocitos) sin perturbar en la interfase. La capa de células mononucleares se transfirió a un nuevo tubo cónico de 50 ml, se agregaron 30 ml de PBS y se centrifugó a 300 \times g durante 10 minutos a TA. Se agregaron 1-2 ml de amortiguador de lisis ACK (ThermoFisher, n.º de cat.: A1049201) a los sedimentos, se mezclaron vigorosamente y se incubaron a TA durante 2 minutos, se agregaron 20 ml de PBS, se centrifugaron a 300 \times g durante 10 minutos a TA. Los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 10 ml de amortiguador MACs helado y las células se contaron por medio de un Cellometer Auto 2000. Se realizó el aislamiento de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ mediante el uso de microperlas de CD4/8 humana Miltenyi (n.º de cat.: 130-045-101; 130-045-201) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se produjeron linfocitos T TFP como se describe anteriormente y se determinó la transducción mediante FACS. Se confirmó expresión de mesotelioma en las células objetivo (línea celular MSLN^{alta} MSTO-211H-FL MSLN (generada de forma interna a partir de MSTO-211H, ATCC, CRL-2081 original)) y la expresión de MSLN-Fc se confirmó en linfocitos T ϵ -TFP SD1 mediante citometría de flujo el mismo día como un ensayo de luciferasa. La suspensión simple de células marcadas con luciferasa (MSTO-211H-FL MSLN-Luc o la línea celular MSLN- C30-Luc (A2780, Sigma)) se preparó en medio R10. Se agregaron 1 \times 10⁴ células objetivo en 100 μ l a una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se agregaron linfocitos T TFP efectores en 100 μ l a diferentes proporciones de efectora a objetivo (E:T) como se indica.

Eficacia de transducción basada en FACS y determinación de activación de linfocitos T

Los linfocitos T TFP se descongelaron, se les retiraron las perlas (si se expandieron *ex vivo* en condición de Dynabeads+IL-2), se lavaron y se volvieron a suspender en el medio de cultivo de linfocitos T sin citocina. La cantidad deseada de linfocitos T (en 100 μ l) se agregó para alcanzar una proporción de efectora a objetivo de 5 a 1, 1 a 1 y 1 a 5, respectivamente. Se prepararon tres replicados para cada tipo de linfocito T a la proporción evaluada. Las células se cultivaron entonces durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después de 24 horas de cocultivo, la placa se centrifugó a 300 \times g durante 2 minutos para sedimentar las células. Se retiraron cuidadosamente 100 μ l de sobrenadante de cultivo de cada pocillo para el ensayo de Luminex. Se agregaron 100 μ l de amortiguador de ensayo a partir de sistema de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ (Promega, n.º E2650) a cada pocillo. El contenido de cada pocillo se mezcló mediante pipeteado cuidadoso hacia arriba y hacia abajo. La mezcla de células y reactivo se dejó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 3 minutos para completar la lisis de las células. Se trasfirieron 200 μ l de lisado celular de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de paredes blancas Greiner-One. La luminiscencia se midió en unidades de luminiscencia relativa (RLU, por sus siglas en inglés) mediante un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices).

El porcentaje (%) de lisis tumoral se calculó mediante la fórmula indicada a continuación:

Luminiscencia (tumor + linfocitos T)

60 % lisis tumoral = 100* [1 - $\frac{\text{Luminiscencia (tumor)}}{\text{Luminiscencia (tumor + linfocitos T)}} \right]$

Ensayo Luminex®

65 Se recogió sobrenadante del cocultivo de linfocitos T y tumor y se almacenó a -80 °C como se describió anteriormente.

Se detectaron los perfiles de citocina mediante el uso de kit Luminex de Millipore (HCD8MAG-15K) según las instrucciones del fabricante. El sobrenadante se colocó en placas sin ninguna dilución y la lectura se midió usando una tecnología Magpix xMAP®.

5 *Modelo de ratón de xenoinjerto de mesotelioma subcutáneo y evaluaciones in vivo*

Se usaron ratones NSG hembra de 6 semanas de edad (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ, n.º de cat.: 005557, Jackson Laboratories) en este estudio. Los ratones se aclimataron durante un mínimo de 3 días bajo la misma condición que el estudio. Las células MSTO-211H-FLMSLN-Luc se suspendieron en PBS estéril a una concentración de 1×10^6 células/100 µl. La suspensión de linfocitos T se mezcló entonces 1 a 1 con Matrigel® helado para un volumen de inyección final de 200 µl para cada ratón. La suspensión celular de PBS/Matrigel® resultante se mantuvo en hielo hasta la administración subcutánea en el flanco trasero dorsal del ratón. El crecimiento tumoral se supervisó como volumen tumoral con medición por calibre. El volumen tumoral se calculó de la siguiente manera:

15 $\text{Volumen tumoral} = \frac{1}{2} (\text{longitud} \times \text{ancho}^2)$

Diez días después de la inyección de células tumorales, los animales se aleatorizaron de acuerdo con el volumen tumoral (200–300 mm³) y se dividieron en 10 grupos para recibir inyección de linfocitos T ε-TFP SD1 de diferentes pacientes (la cantidad de ratones por grupo varía dependiendo de la cantidad de linfocitos T ε-TFP SD1 recuperados el día de la inyección). El día de la inyección de linfocitos T se consideró el día 0 del estudio. Los linfocitos T se prepararon en PBS estéril a una concentración de 5×10^6 células/100 µl. La suspensión celular se inyectó entonces por vía intravenosa en el ratón por la vena de la cola.

25 *Expansión ex vivo de linfocitos T ε-TFP SD1 de pacientes con cáncer de ovario*

Se prepararon linfocitos T TFP sdAb específicos de MSLN con formatos de CD3ε que codifican lentivirus de TFP con aglutinante SD1 dirigidos a MSLN. La proporción de expansión, determinada como el recuento de células viables el día 10, oscilaba de 8,58 a 28,2 veces (17,8 +/- 3,3) en comparación con el día 0 en células preparadas con Dynabeads®+IL-2, y 10 a 33,6 veces (22,9 +/- 5,0) en comparación con el día 0 en células preparadas con TransAct® + IL-7/15. La eficacia de transducción para los linfocitos T ε-TFP SD1 se determinó en el día 10 de expansión mediante tinción en la superficie para detectar la presencia de GFP y MSLN-Fc en poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. La eficacia de transducción oscilaba de 28,6 % a 52,1 % (40,9 +/- 4,0%) en las células preparadas con Dynabeads+IL-2, y 5,7 % a 46,9 % (26,8 +/- 6,3 %) en células preparadas con TransAct+IL-7/15; no se observaron diferencias significativas en la proporción de expansión y la eficacia de transducción entre las condiciones de Dynabeads+IL-2 y TransAct+IL-7/15. La cantidad de copias de vector por célula fue congruente con la eficacia de transducción, con una cantidad de copias de alrededor de 1~2 por célula en las condiciones de Dynabeads+IL-2 o TransAct+IL7/15, excepto para el paciente 1, que tuvo una cantidad de copias de vector de 0,38 por célula.

40 *Actividad antitumoral in vitro de linfocitos T ε-TFP SD1 de pacientes con cáncer de ovario*

Se evaluó la eficacia *in vitro* de linfocitos T ε-TFP SD1 de pacientes con cáncer de ovario mediante el uso de ensayos de lisis de célula tumoral indicadora de luciferasa. Se confirmó la expresión de mesotelina en líneas celulares MSTO-211H-FLMSLN-Luc en el día del ensayo (**FIG. 13B**); todos los linfocitos T ε-TFP SD1 presentaron diferentes niveles de destrucción tumoral. Se observó una lisis de células tumorales potente para los pacientes 1, 2, 4 y 5 (75 %~97 %). Los linfocitos T ε-TFP MSLN se cocultivaron con MSTO-211H-FLMSLN-Luc (con expresión de MSLN elevada) a una proporción de efectora con respecto a objetivo de 5 a 1, el paciente 3 presenta ~ 35 % de lisis tumoral a una proporción de efectora con respecto a objetivo de 5 a 1, 4 de 5 pacientes (los pacientes 1, 2, 4 y 5) presentan un promedio de 50 % de lisis tumoral a una proporción de efectora con respecto a objetivo de 1 a 1, 2 de 5 (pacientes 4 y 5) presentan ~50 % de evento de lisis tumoral a una proporción de efectora con respecto a objetivo de 1 a 5. Todos los linfocitos T presentaron una destrucción rápida de las células tumorales. No se observó lisis tumoral en todos los linfocitos T ε-TFP™ MSLN cuando se cocultivaron con líneas celulares negativas para mesotelina C30-Luc (**FIG. 13C**). El perfil de citocina de ε-TFP MSLN de cinco pacientes se analizó mediante el uso de un panel de CD8 Luminex®, citocinas citolíticas tales como IFN-γ, GM-CSF, Granzima-A/B, IL-2, MIP-1α/β, TNF-α y perforina aumentaron significativamente en los linfocitos T ε-TFP™ MSLN en comparación con los linfocitos T no transducidos (**FIG. 13D-L**).

55 *Eficacia in vivo de linfocitos T ε-TFP MSLN en modelo de xenoinjerto de ratón de tumor que expresa MSLN*

Se usó MSTO-211H-FLMSLN-Luc para establecer un modelo de ratón de xenoinjerto de tumor que expresa mesotelina por vía subcutánea. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana. En el día 10 después de la inyección tumoral, el volumen tumoral promedio alcanzó 200-300 mm³ y los linfocitos T ε-TFP MSLN expandidos en el día 10 de un donante normal (ND12, **FIG. 14A**) y de los pacientes 1-4 (**FIG. 14B-E**) y se descongelaron y se confirmó la eficacia de transducción. 5×10^6 linfocitos T ε-TFP MSLN por ratón o linfocitos T no transducidos equivalentes se inyectaron por vía i.v. y se supervisaron los volúmenes tumorales después de esto. Linfocitos T ε-TFP MSLN de 3 de 4 pacientes (pacientes 1, 2 y 4) presentaron una eliminación tumoral completa al día 20 después de la inyección de linfocitos T. La eliminación tumoral se mantuvo hasta el día 40. Cinco de seis ratones recibieron linfocitos T ε-TFP MSLN del paciente 3, que presentaron una protección parcial. De los cuatro pacientes que recibieron linfocitos T ε-TFP MSLN

de ND12, uno presentó una eliminación tumoral completa, dos presentaron eliminación tumoral parcial.

Notas finales

- 5 Si bien en la presente se han mostrado y se han descrito modalidades preferidas de la invención, será evidente para los expertos en la técnica que dichas modalidades se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas variaciones, cambios y sustituciones sin alejarse del espíritu de la invención. Se entenderá que, en la práctica de la invención, se pueden emplear varias alternativas a las modalidades de la invención que se han descrito en la presente.

10

ANEXO A: RESUMEN DE SECUENCIAS

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
1	Enlazador corto 1	GGGGSGGGSGGGGSLE
2	Enlazador corto 2	AAAGGGSGGGSGGGGSLE
3	Enlazador largo	AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGSGGGGSLE
4	CD3-ε humana	MQSGTHWRVLGLCLLSGVVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEI LWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHSLKEFSELEQSGYYVCPRGSKPEDANFYLYL RARVCENCMEMDVMSVATIVIDICITGGLLLVYYWSNRKAKAKPVTRGAGAGGRQ RGQNKERPPVPNPDYEPIRKGQQRDLYSGLNQRRI
5	CD3-γ humana	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGHNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDG KMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSPLQVYYRCQNCIENLAATIS GFLFAEIVSIFVLAGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHL QGNQLRRN
6	CD3-δ humana	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLSDITRLDL GKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLAL GVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS
7	CD3-ζ humana	MWKALFTAILQAAQLPITEAQSFGLDPKLCYLLDILFIYGVILTAFLRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNENLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
8	cadena α de TCR humano	MAGTWLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVCLVLDVAPPGLD SPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHSLPSEELASWEPLVCHTPGAEQ HSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWGLVRLLLFKLLLFDLLTCSCLC DPAGPLPSPATTTRLRALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRGDTTPGRKP GSPVWGEGLSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGA
9	región C de cadena α de TCR humano	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCVCLTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMD FKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQN LSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
10	CTL-L17 de región V de cadena α de TCR humano	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDY TNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHSLHIVP SQPGDSAVYFCAAKGAGTAKSLTFTGTRLQVTL
11	región C de cadena β de TCR humano	EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEV HSGVSTDPPQPLKEQPALNDSRYCLSSRRLVSATFWQNPRNHFCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
12	CTL-L17 de región V de cadena β de TCR humano	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPISEHNRL YWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLSDRFSAKERPKGSFSTLEIQRTEQ GDSAMYLCASSLAGLNQPQHFDGTRLSIL
13	YT35 de región V de cadena β de TCR humano	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLF WYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPR DSAVYFCASSFSTCSANYGYTFGSGTRLTVV

(continuación)

(continuación)

(continuación)

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
		gcgagacccacgctcaccggctccagatttacagcaataaaccagccagccggaaagggccag cgcagaagtggctctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattttgcggaaagctagagtaa gtatcgccagtaatagttgcacgttgtccatccgtacaggcatcggtgtcacgcgtcgta ttgtatggctcattcgactccgggtcccaacgatcaaggcagttacatgtatcccccattgtgca aaaagcggtagtcctcggctccgatcgatgtcagaagtaagttggcccaactgttatcactcatg gttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatcgtaagatgccttctgtactgtgagact caaccaagtattctgagaatagtgtatgcggcaccgagttgtctgcccggcgtcaatacgggat aataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcatggaaaacgttccggggcggaaaact ctcaaggatctaccgtgttagatccagtgatgtacccactcgtgcacccaactgtatctcagca cttttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaaggcaaaatggccaaaaaggaa taaggcgacacggaaaatgtgaataactcataactctccctttcaattattgaagcatttatcagggtt ttgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaccaatagggttccgcgcacatttc cccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgt atcagcaggcccttcgtcgcgttgcgtatgcggtaaaaacctctgacacatgcagctcccg gagacggtcacagctgtctgttaagcggatgcggggagcagacaagccgtcagggcgcgtcagc gggttgtggcggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcacc atatgcgtgtgaaataccgcacagatgcgttaaggagaaaataccgcacaggcgcattcgcatt caggctgcgcaactgtggaaaggcgatcggcggccttcgtcttgcattacgcgcgtggca ggggatgtgctgcaaggcattaagttggtaacgcgcagggtttccagtcacgcacgttggaaa gacggccagtccaaactgt
15	secuencia de aminoácidos de MSLN: secuencia de mesotelina humana (n.º de acceso de UniProt Q13421)	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLD GVLANPPNISSLSRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQNKLST EQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKAN VDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSSLSEADVRALGGLACDLPGRF VAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPTWSVS TMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPWRQPERTILRPR FRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAI PFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTS LETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGY LCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMN GSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRDVALPLTV EVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLTLGLGLQGGIPNG YLVLDSMQUEALSGTPCLLGPVPLTVALLLASTLA

(continuación)

(continuación)

(continuación)

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
18	Aminoácido de cadena ligera anti-MSLN (MHC1445LC.1)	DVMMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQS PKLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKIRVEAEDLGVFFCSQST HVPLTFGSGTKLEIK
19	ADN de cadena ligera anti-MSLN (MHC1445LC.1)	gatgttgtatgacccaaactccacttccctgcgtcagtctggagatcaaggccatctctgcag atctagttagcagccgttacacagtaatggaaacacccattttacattggtaacctgcagaaggccaggcc agtctccaaagctctgtatctacaaagttccaaccgatttctgggtccccagacaggtttagtggca gtggatcaggactgatccactcaagatcaccagatggaggctgaggatctggagttttctgc ctctcaaagtacacatgtccattcacgttcggctgggacaaagttggaaataaaa
20	Aminoácido de cadena pesada anti-MSLN (MHC1445HC.1)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCSKASGYTFFDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIDGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCT DYYGSSYWYFDVWGTGTTVTVSS
21	ADN de cadena pesada anti-MSLN (MHC1445HC.1)	caggtcaactgcagcagtctgggctgagctggtaggcctgggcttcagtgcgcgtctgcgaa ggctcgggctcacattttactatgaaatgcactggtaagcagacacccgtcatggcctggaa atggattggagttatgtatccgttacaaattgtatggtaactgcctacaatcagaagtcaagggcaaggccat actgactgcagacaaatccacgttcggccacagccatccgttacatggagctccgcagcgcacatctgaggactct gccgtctattactgtacagattactacggtagtagtactgttactcgatgtctgggacacaggacca cggtcaccgtctcctc
22	Aminoácido de cadena ligera anti-MSLN (MHC1446LC.1)	DVMMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWFLQKPGQS PKLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTT HVPLTFGAGTKLELK
23	ADN de cadena ligera anti-MSLN (MHC1446LC.1)	gatgttatgtatgacccaaactccacttccctgcgtcagtctggagatcaaggccatctctgcag atctagttagcagccgttacacagtaatggaaacacccattttacattggtaacctgcagaaggccaggccat gtctccaaagctctgtatctacaaagttccaaccgatttctgggtccccagacaggtttagtggcagt ggtatcaggacagatttacactcaagatcagcagatggaggctgaggatctggagttattctgc ctctcaaactacacatgtccgtcagttccggctgggaccaagctggagctgaaa
24	Aminoácido de cadena pesada anti-MSLN (MHC1446HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCSKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIAGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCS RYGGNYLYYFDYWGQGTTLVSS
25	ADN de cadena pesada anti-MSLN (MHC1446HC.3)	caggtcaactgcagcagtctgggctgagctggtaggcctgggcttcagtgcgcgtctgcgaa ggctcgggctcacatttactgtactatgaaatgcactggtaagcagacacccgtccatggcctggaa atggattggagttatgtatccgttacaaattgtatggtaactgcctacaatcagaagtcaagggcaaggccat actgactgcagacaaatccacgttcggccacagccatccgttacatggagctccgcagcgcacatctgaggactct gccgtctattactgtcaagatcggtagtaactaccattactactttactacttactctgggcaaggacca ctctcacagtcctc
26	Aminoácido de cadena ligera anti-MSLN (MHC1447LC.5)	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVYNGNTYLEWYLQKPGQSP KLLIYKVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSH VPFTFGSGTKLEIK
27	ADN de cadena ligera anti-MSLN (MHC1447LC.5)	gatgtttgtatgacccaaattccacttccctgcgtcagtctggagatcaaggccatctctgcaga tctagttagcagacattgttacatggaaacacccattttacatggtaacctgcagaaggccaggccat gtctccaaagctctgtatctacaaagttccaaccgatttctgggtccccagacaggtttagtggcagt ggtatcaggacagatttacactcaagatcagcagatggaggctgaggatctggagttattactgc ctttcaaggttacatgtccattcacgttcggctgggacaaagttggaaataaaa
28	Aminoácido de cadena pesada anti-MSLN (MHC1447HC.5)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCSKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIGGSAYNQKFKGRAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCT GYDGYFWFAYWGQGTLTVSS

(continuación)

(continuación)

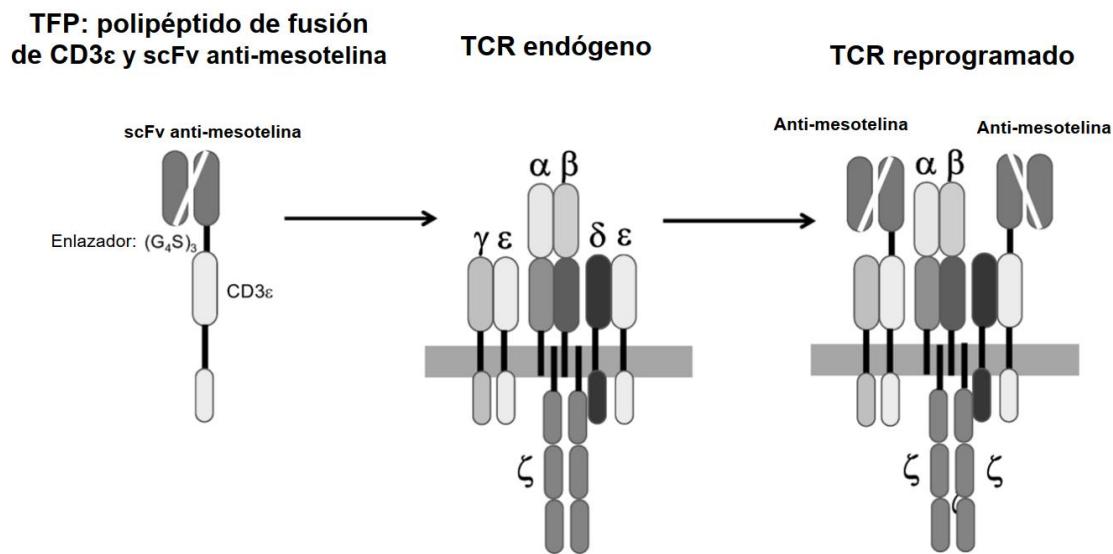
SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
40	Aminoácido de cadena pesada anti-MSLN (MHC1450HC.5)	QVQLQQSGAELARPGTSVKVSCKASGYTFTSYGISWVKQRIGQGLEWI GEIHPRGNSYYNEKIRGKATLTADKSSSTAYMELRSLISEDSAVYFCAR LITTVVANYYAMDYWGQQGTSVTVSS
41	ADN de cadena pesada anti-MSLN (MHC1450HC.5)	caggttcagctgcagcagtctggagctgagctggcgaggcctggacttcagtgaagggtgcctgca aggctctggctataccttcacaaggatggataagctggtaagcagagaattggacaggccttg agtggattggagagattcatcctagaatggtaatgtactataatgagaagatcagggcaaggc cacactgactgcagacaatccctcagcacagcgtacatggagctccgcagcctgatatctgagga ctctgcggctattctgtcaaggctgattactacggtagtgtctaattactatgctatggactactggggt caaggaacctcagtcaccgtctcctca
42	Aminoácido de cadena ligera anti-MSLN (MHC1451LC.1)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPG QSPKLLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQ SYNLVTFGAGTKLELK
43	ADN de cadena ligera anti-MSLN (MHC1451LC.1)	gacattgtatgtcacagtctccatccctccctggctgtcagcaggagagaaggcactatgagctgc aaatccagtcagactgtcgtcaacagttagaaccgaaagaactactggctgttaccacgcagaaa ccaggcagtcctctaaactgctgtactggcatccactagggaaatctgggtccctgatcgcctc acaggcagtggtactggacagattctcaccatcagcagtgtcagggctgaagacactggcag ttttattactgcaaacaatcttataatctggcacgttcggctgtggaccgaactggagctgaaa
44	Aminoácido de cadena pesada anti-MSLN (MHC1451HC.2)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFFDYEMHWVKQTPVHGLEW IGAIDPEIDGTAYNQFKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYCT DYYGSSYWYFDVWGTGTTVSS
45	ADN de cadena pesada anti-MSLN (MHC1451HC.2)	caggttcaactgcagcagtctgggctgagctggtagggcctgggcttcagtgcacgcgtctgc aaaggcttcgggctacacatttttgcataatgaaaatgcactggtaagcagacacccgtcgtcatggcctgaa atggattggagctattgtatcctgaaattgtatggactgcctacaatcagaatgtcaaggcataaggccat actgactgcagacaatccctcagcacagcctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactct gccgtctattactgtacagattactacggtagtagctactgtactcgtatgtctgggacagggacca cggtcaccgtctcctc
46	Aminoácido de cadena ligera anti-MSLN (MHC1452LC.1)	QIVLTQSPAAMSASPGEKVTISCSASSSVSYMWYQQKPGSSPKPWIYR TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPLTF GAGTKLELK
47	ADN de cadena ligera anti-MSLN (MHC1452LC.1)	caaattgttctcacccagtcctccagcaatcatgtctgcacatccaggggagaaggcaccatcatcgc atgtccagtcagtgtaagttacatgtactggtagccaggcagaagccaggatccctcccaaaacctt ggatttatcgacatccaaacctggctctggagtcctgctcgttcagtgccatggctgggatggactct tactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgtccacttattactgccagcagatcatagt acccaactcacgttcggctgtggaccgaactggagctgaaa
48	Aminoácido de cadena ligera anti-MSLN (MHC1452LC.6)	QIVLTQSPAAMSASPGERVTMTCSSSSVSSSYLYWYQQKSGSSPKLWI YSISNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINSMEAEDAATYYCQQWSSNPQLTFGAGTKLELK
49	ADN de cadena ligera anti-MSLN (MHC1452LC.6)	caaattgttctcacccagtcctccagcaatcatgtctgcacatccctggggacgggtcaccatgacgc atgtccagtcagtgtaagttccagctactgtactggtagccaggcagaagtcaggatccctcccaaa actctggattatagcatatccaaacctggctctggagtcctgctcgttcagtgccatggcagtggtctggg acctcttactctcacaatcaacagcatggaggctgaagatgtccacttattactgccagcagtg agtagtaacccacagtcacgttcggctgtggaccgaactggagctgaaa
	Aminoácido de cadena pesada anti-MSLN (MHC1452HC.2)	QVQLKQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWI GKIGPGSGSTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA RTGYYVGYYAMDYWGQQGTSVTVSS

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
50	ADN de cadena pesada anti-MSLN (MHC1452HC.2)	caggccagctgaaggcagtcggagctggagctggtaaggccggggcttcagtgaagatatacctgcaaggctctggctacaccctcactgactactatataaactgggtgaagcagaggcctggacaggcccttggattggaaagattggctctgaaagtggtagtacttactacaatgagaagttcaaggggcaaggccacactgactgcagacaaatccctcagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcagtctattctgtcaagaactggttactacgttggactatgtctatggactactggggtaagaaacctcagtcaccgtcctca
51	Aminoácido de cadena pesada anti-MSLN (MHC1452HC.4)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYFTIYGISWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARWYSFYAMDYWGQGTSVTVSS
52	ADN de cadena pesada anti-MSLN (MHC1452HC.4)	caggccagctgcagcagtcggagctggagctggcgaggccggggcttcagtgaagctgtcctgcaaggctctggctacaccctcacaatctatggtataagctgggtgaaacagagaactggacaggcccttggattggagagattatcctagaagtgataatacttactacaatgagaagttcaaggggcaaggccacactgactgcagacaaatccctcagcacagcgtacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgcggctatttctgtcaagatggtaactcgctatgtctatggactactggggtaaggaacacctcagtcaccgtcctca
53	Aglutinante 1 de dominio simple (SD1) anti-MSLN	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYWYRQAPGKRELVARISSGRGVVDYVESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
54	Aglutinante 4 de dominio simple (SD4) anti-MSLN	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWYRQAPGKERELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTYIPYGGTLHDFWGQGTLVTVSS
55	Aglutinante 6 de dominio simple (SD6) anti-MSLN	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWYRQAPGTERDLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNA

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico recombinante aislada que codifica una proteína de fusión (TFP) del receptor de linfocitos T (TCR) que comprende
- 5 (a) una subunidad de TCR que comprende
- (i) al menos una parte de un dominio extracelular de TCR de una subunidad de TCR CD3 épsilon,
 (ii) un dominio transmembrana de una subunidad de TCR CD3 épsilon, y
 10 (iii) un dominio intracelular de una subunidad de TCR CD3 épsilon que incluye su dominio de señalización; y
- (b) un scFv o sdAb humano o humanizado que comprende un dominio de unión a anti-mesotelina; donde la subunidad de TCR y el dominio de unión a anti-mesotelina están unidos operativamente, y donde la molécula de TFP es capaz de interactuar de forma funcional con un complejo endógeno de TCR y/o al menos un polipéptido endógeno de TCR, donde el dominio de unión a anti-mesotelina codificado está conectado al dominio extracelular de TCR codificado por una secuencia enlazadora codificada.
- 15 2. La molécula de ácido nucleico recombinante aislada de la reivindicación 1, donde la secuencia enlazadora codificada comprende $(G_4S)_n$, donde $n=1$ a 4.
- 20 3. La molécula de ácido nucleico recombinante aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el dominio intracelular de TCR que comprende un dominio estimulante tiene una, dos o tres modificaciones en la secuencia de aminoácidos.
- 25 4. La molécula de ácido nucleico recombinante aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la molécula de ácido nucleico recombinante es: un plásmido o un vector viral.
5. La molécula de ácido nucleico recombinante aislada de la reivindicación 4, donde el vector viral es un vector adenoviral o un vector lentiviral.
- 30 6. Una célula humana que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. La célula humana de la reivindicación 6, donde la célula humana es: un linfocito TCD8+ o un linfocito T CD4+.
- 35 8. Una composición que comprende una célula que expresa la molécula de ácido nucleico recombinante aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método para tratar a un mamífero que tiene una enfermedad seleccionada de mesotelioma, carcinoma de células renales, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer cerebral, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, cáncer de uréter, cáncer de riñón, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de timo y colangiocarcinoma donde las células enfermas del mamífero expresan mesotelina.
- 40 9. La composición para el uso de la reivindicación 8, donde la célula es un linfocito T autólogo o un linfocito T alogénico.
- 45

**FIG. 1**

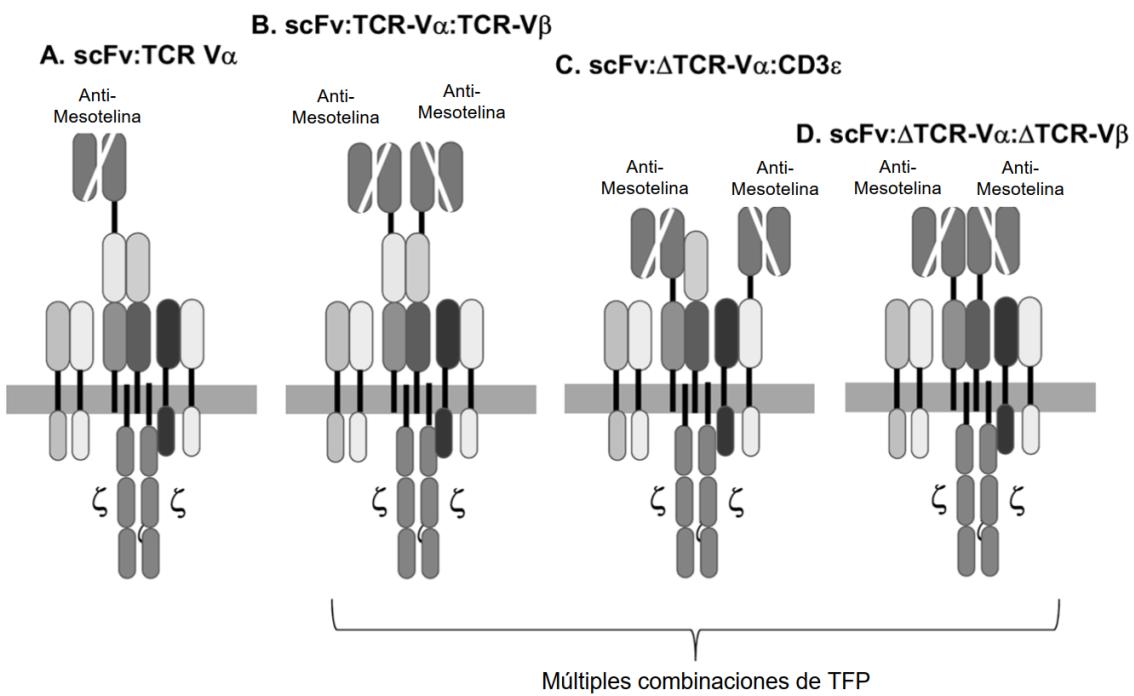


FIG. 2

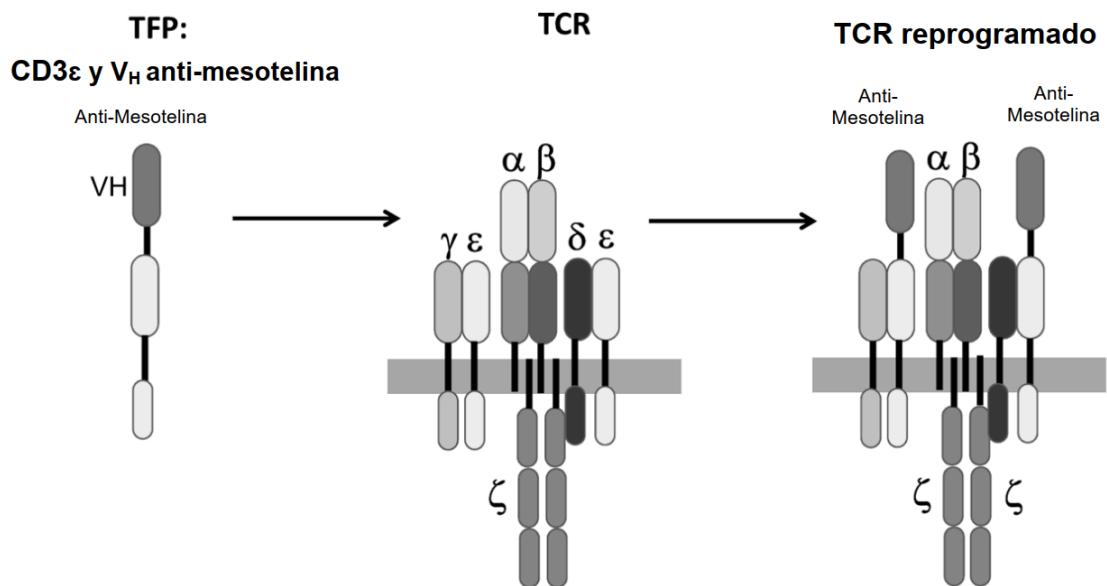
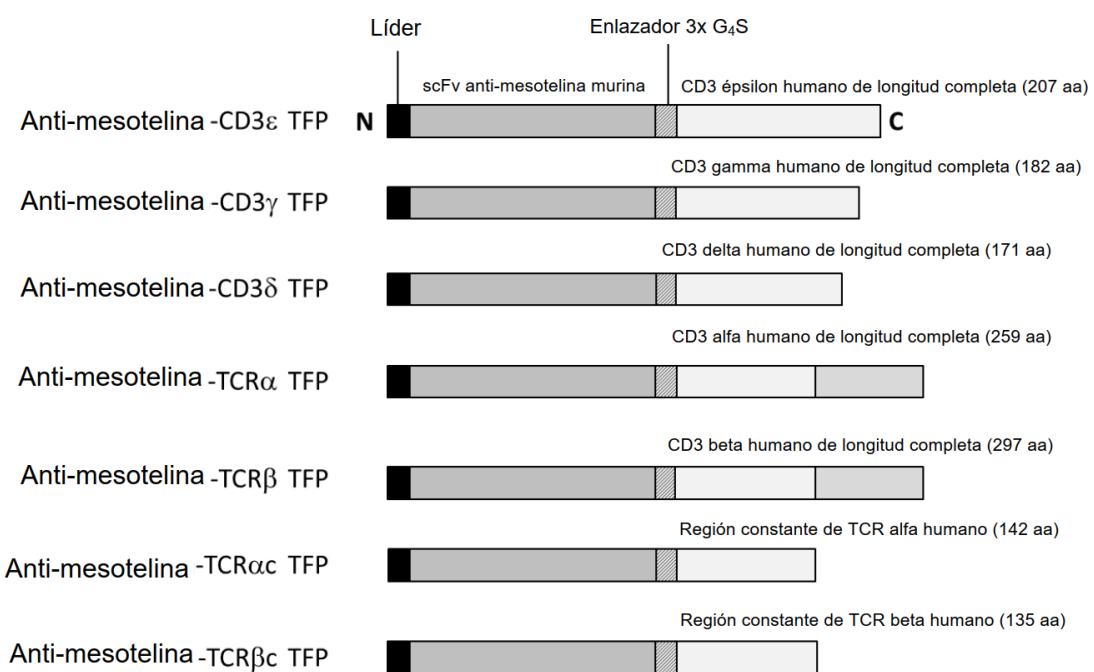


FIG. 3

**FIG. 4**

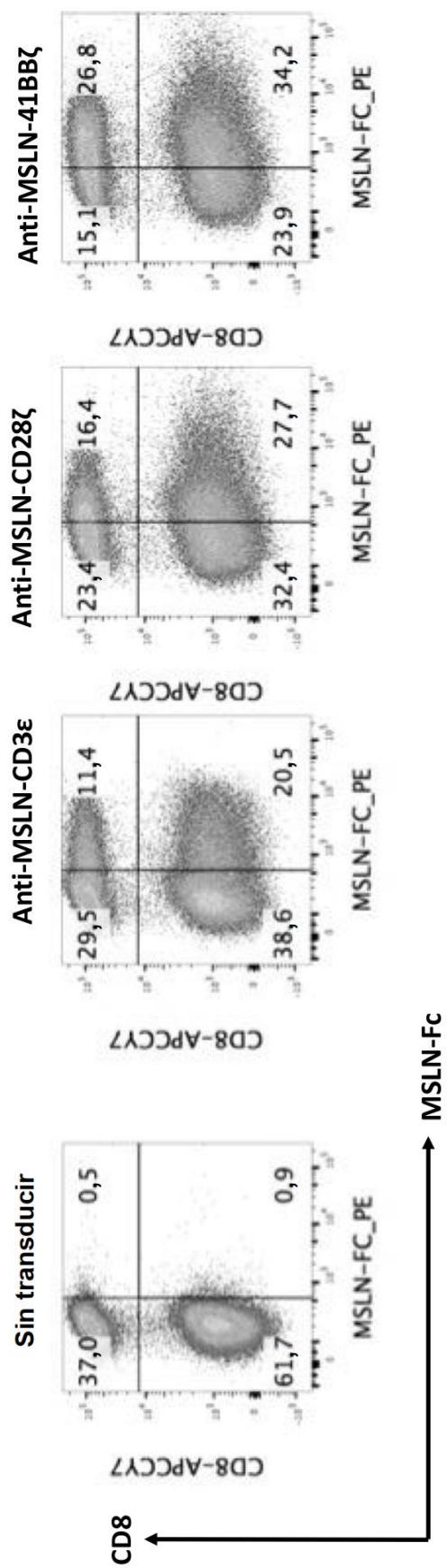
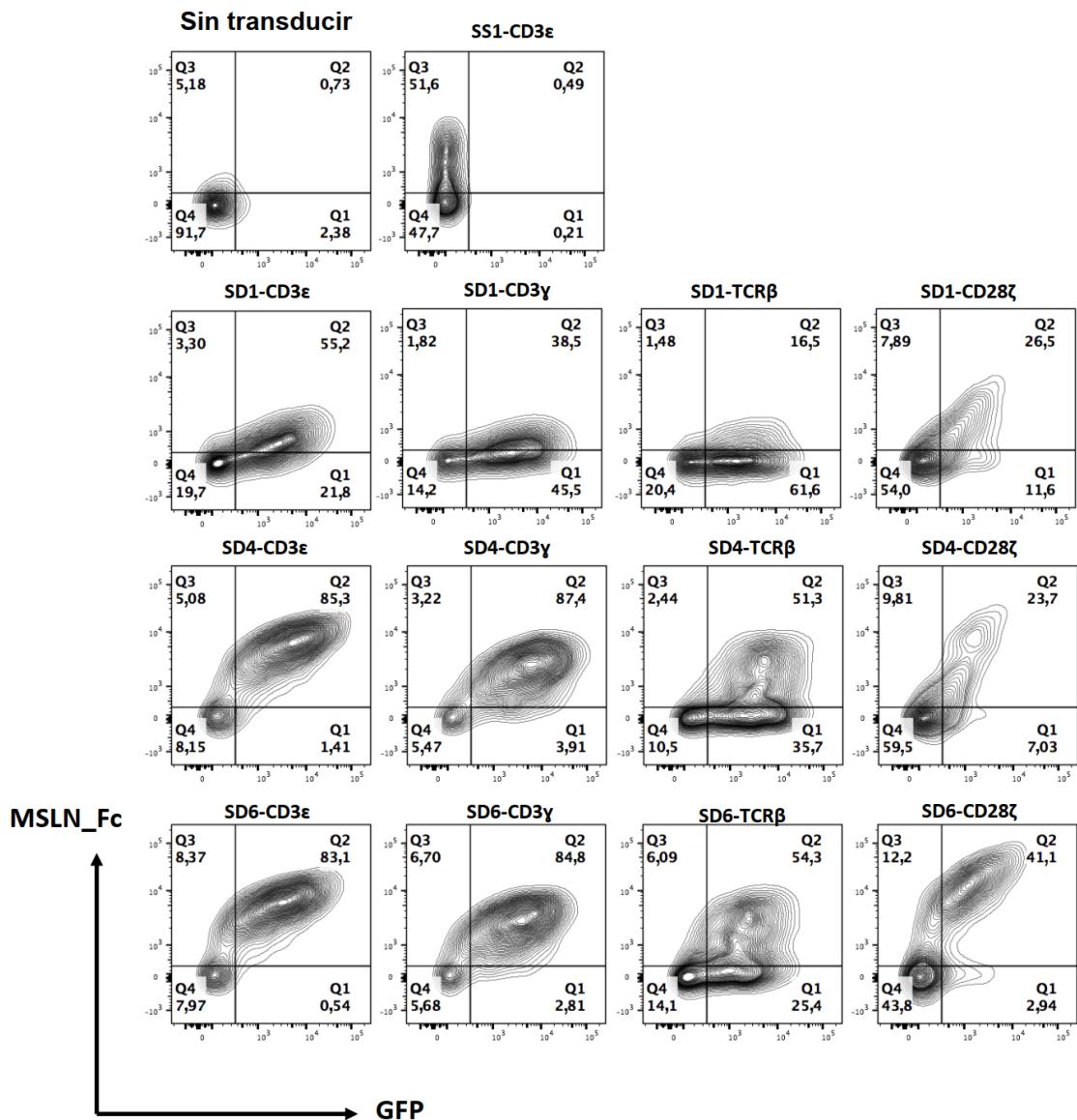


FIG. 5A



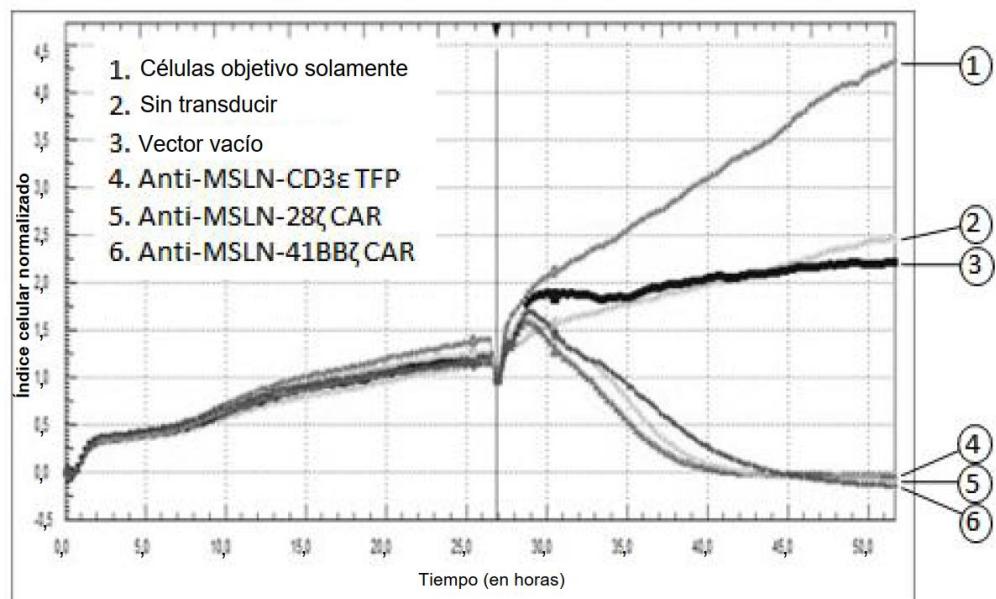


FIG. 6A

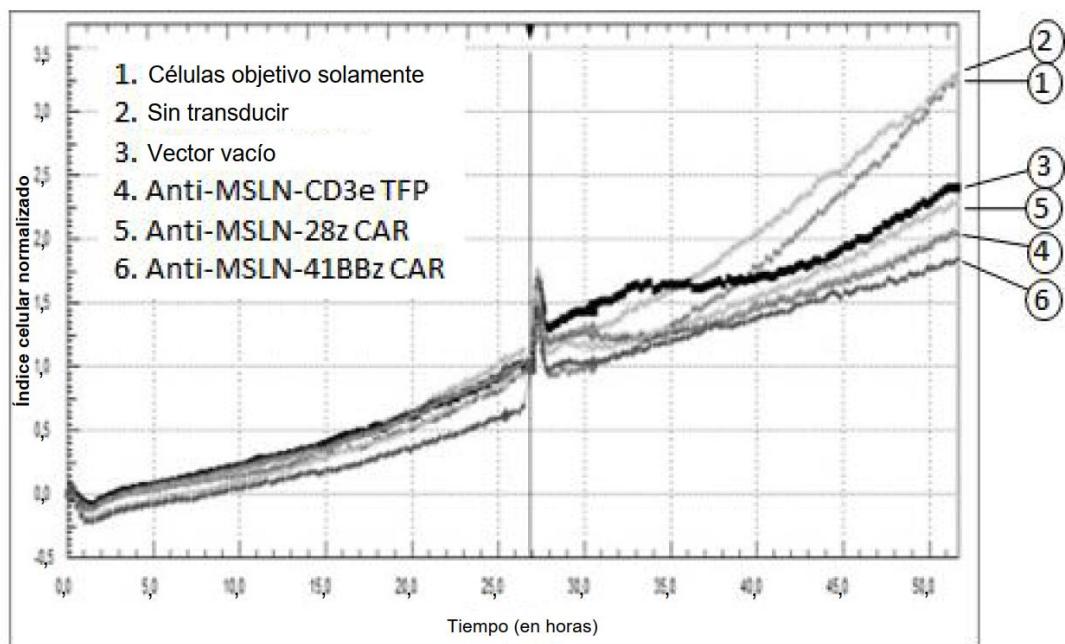


FIG. 6B

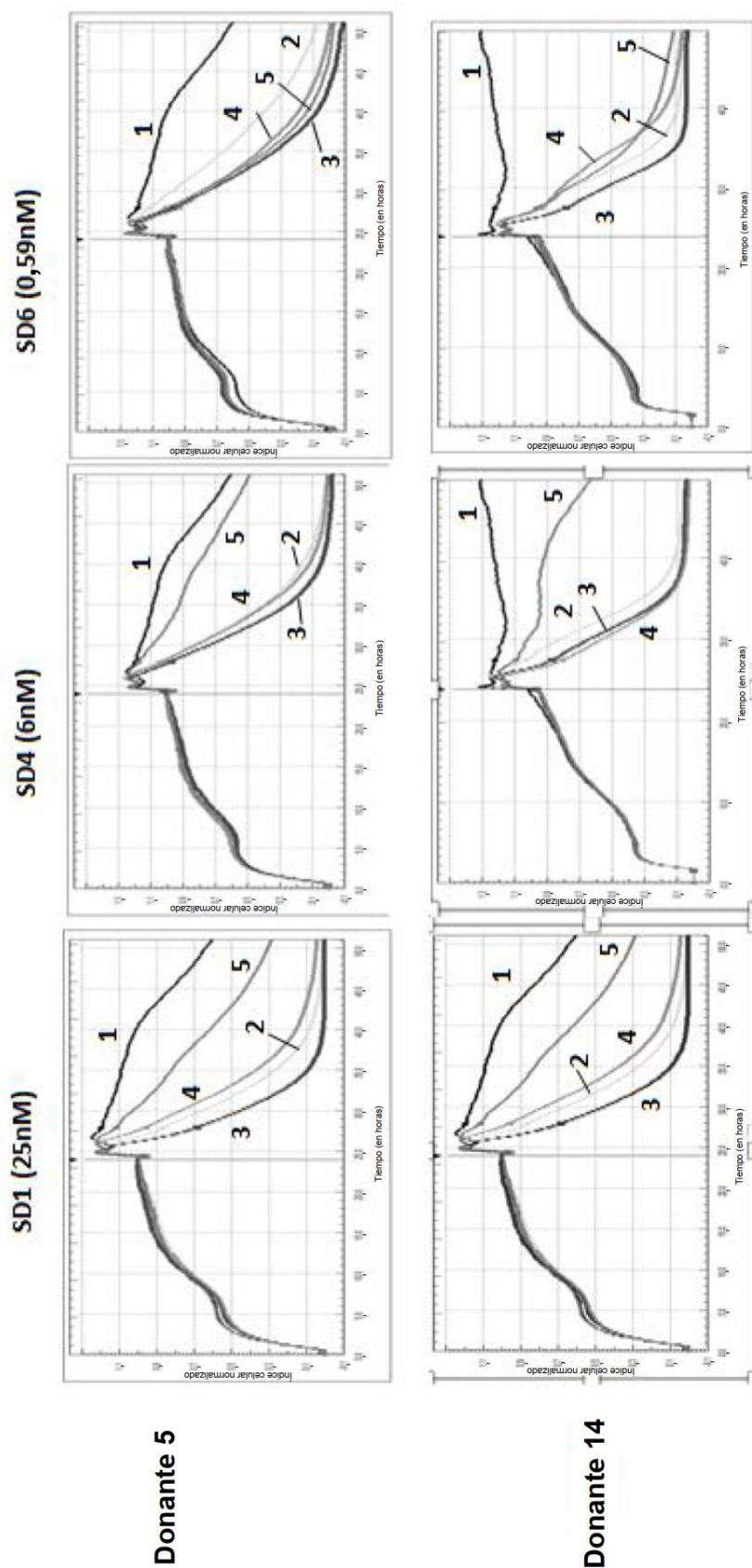


FIG. 6C

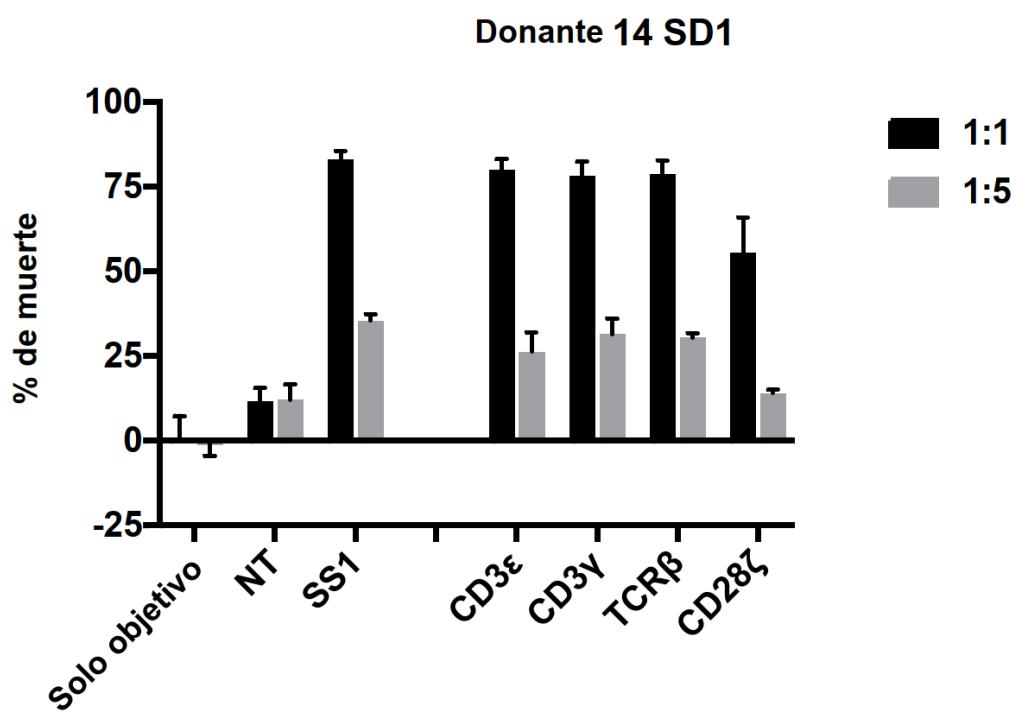


FIG. 7A

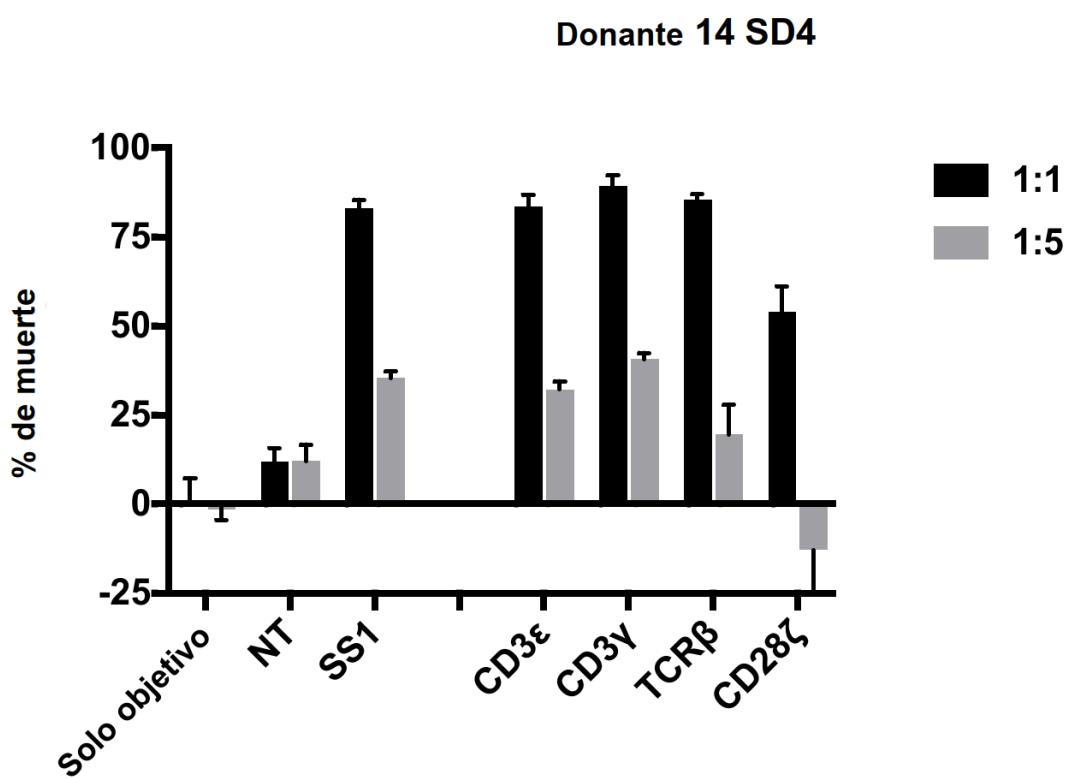


FIG. 7B

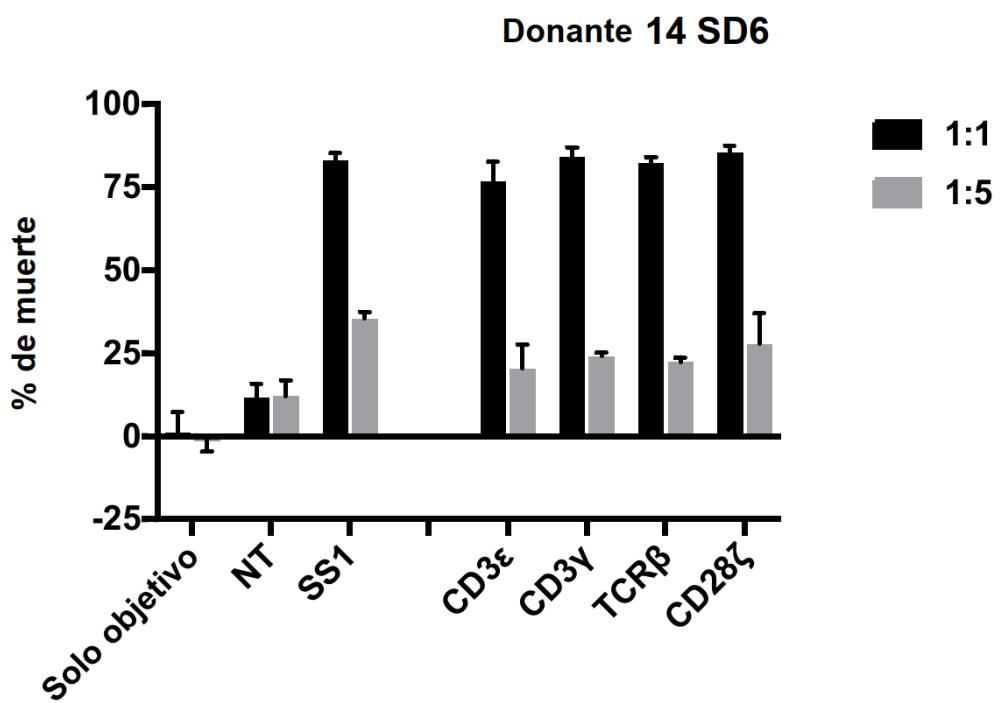


FIG. 7C

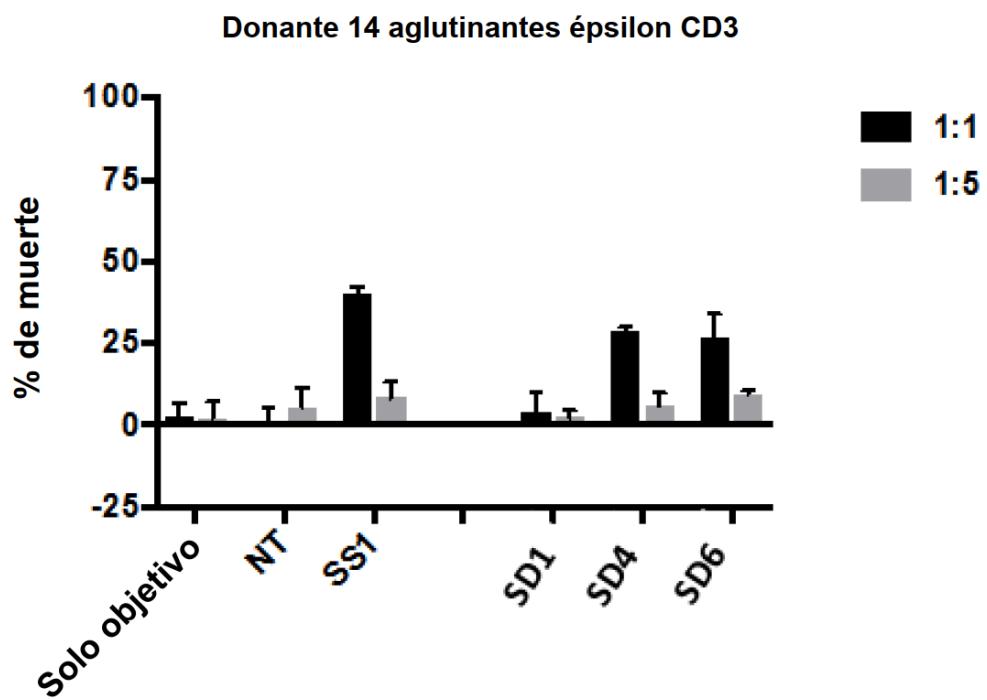
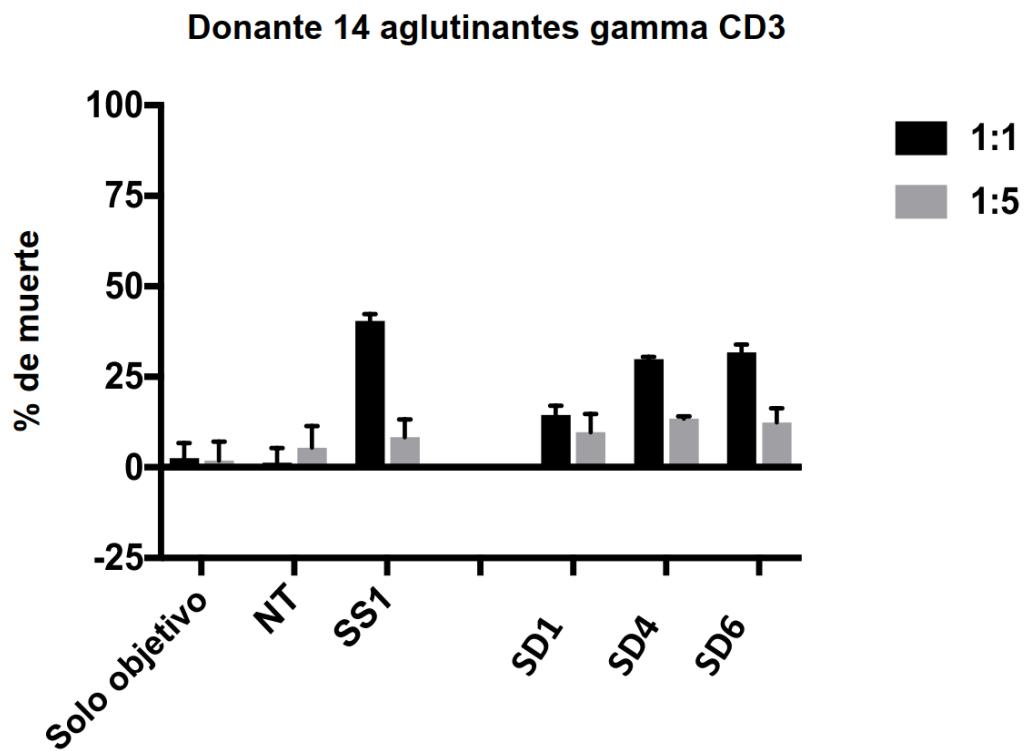


FIG. 8A

**FIG. 8B**

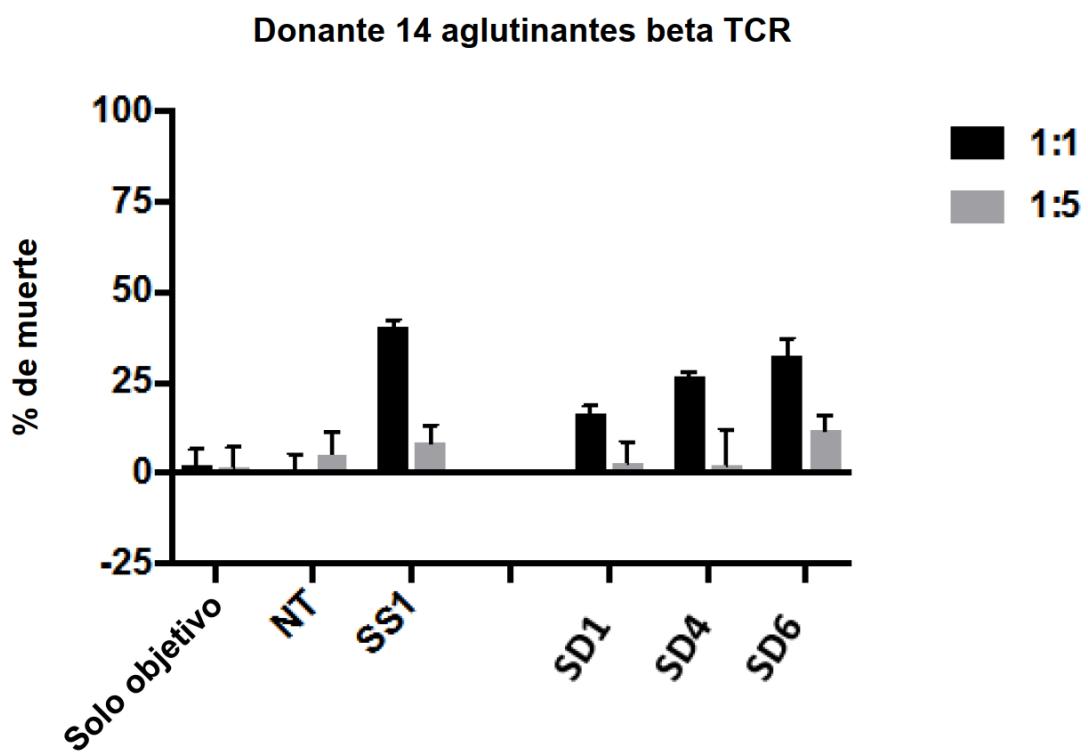
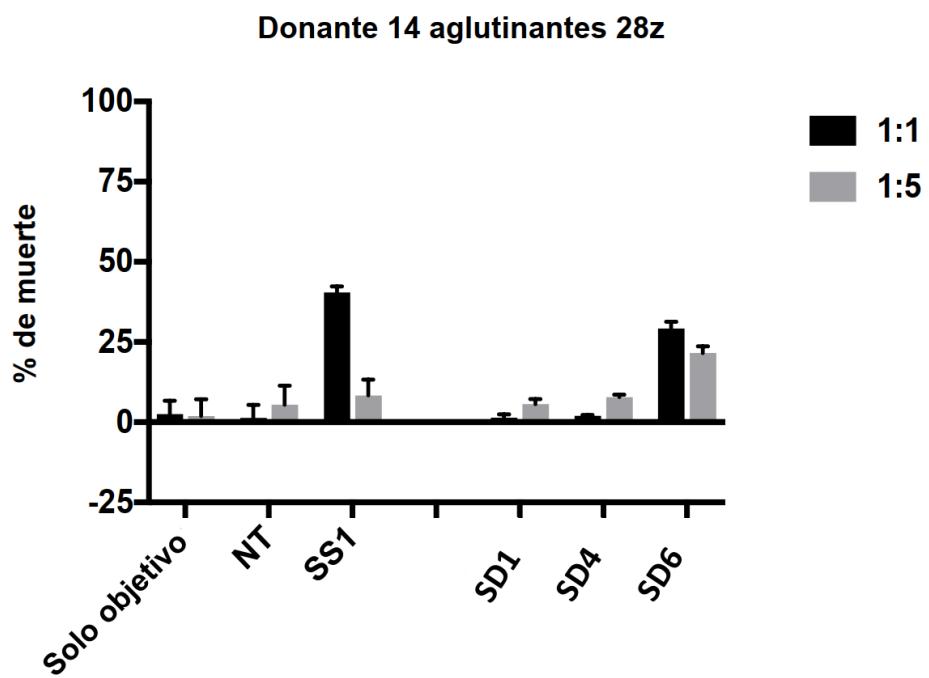


FIG. 8C

**FIG. 8D**

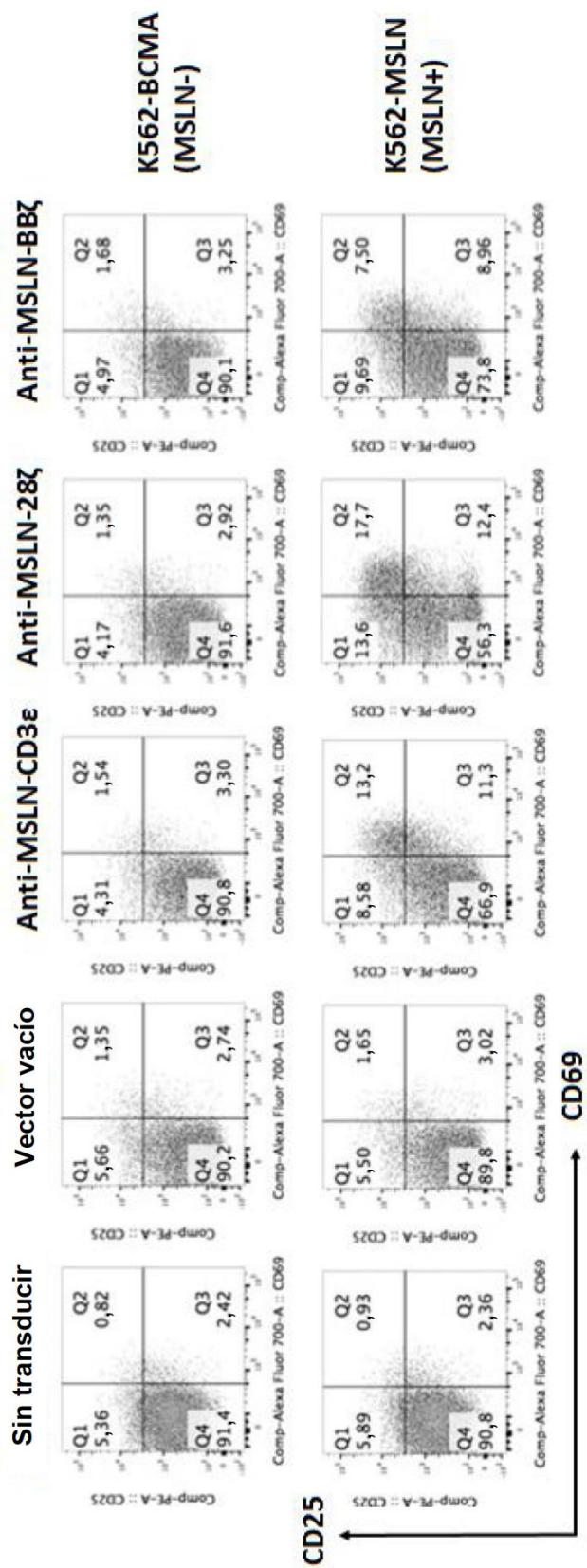


FIG. 9A

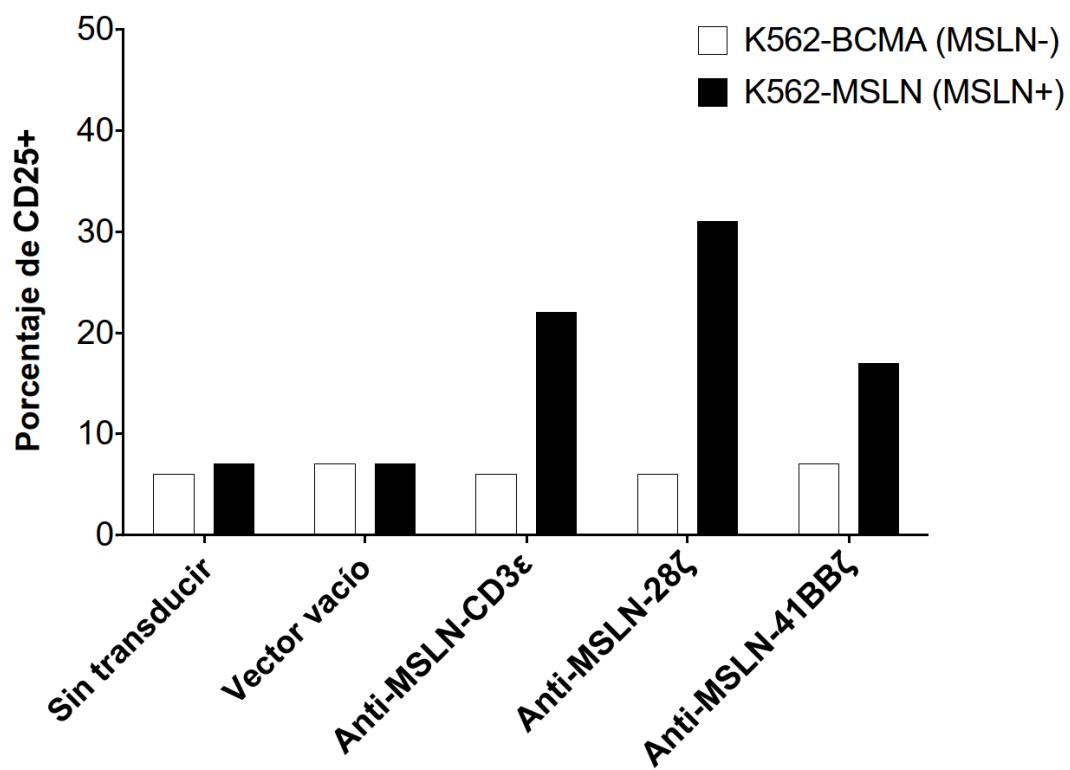


FIG. 9B

% de activación: suma de células CD25+, CD69+ y CD25+CD69+

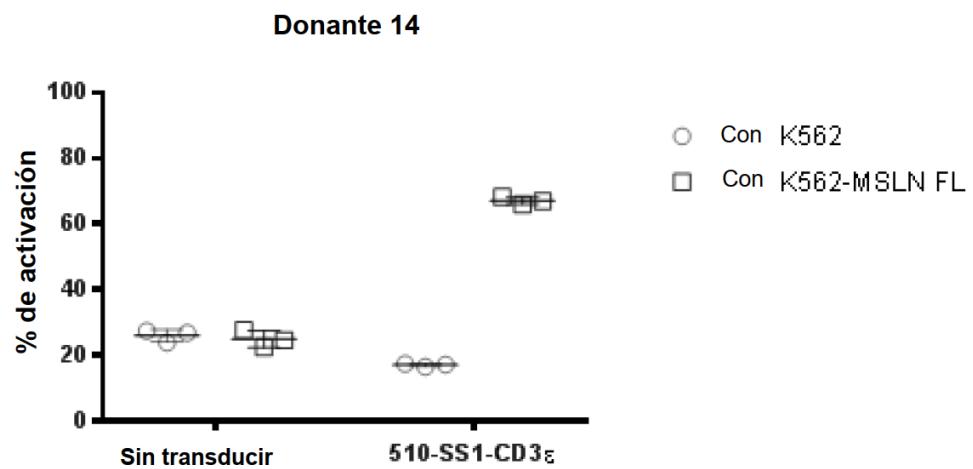


FIG. 9C

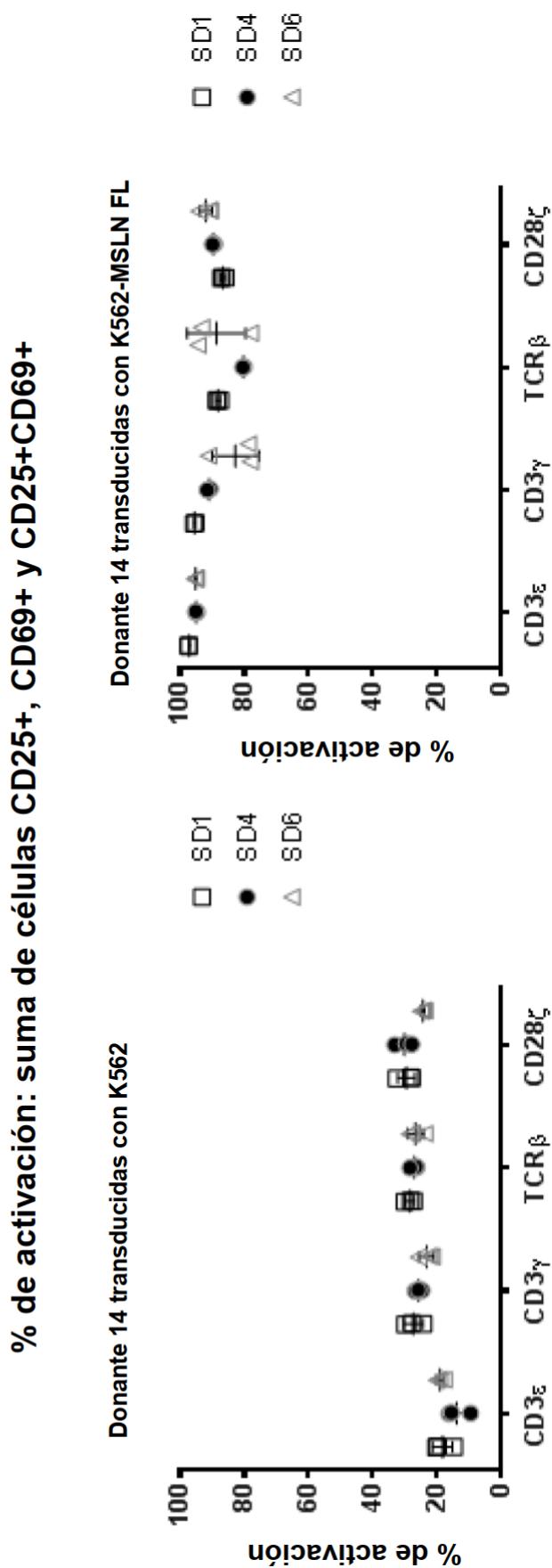


FIG. 9D

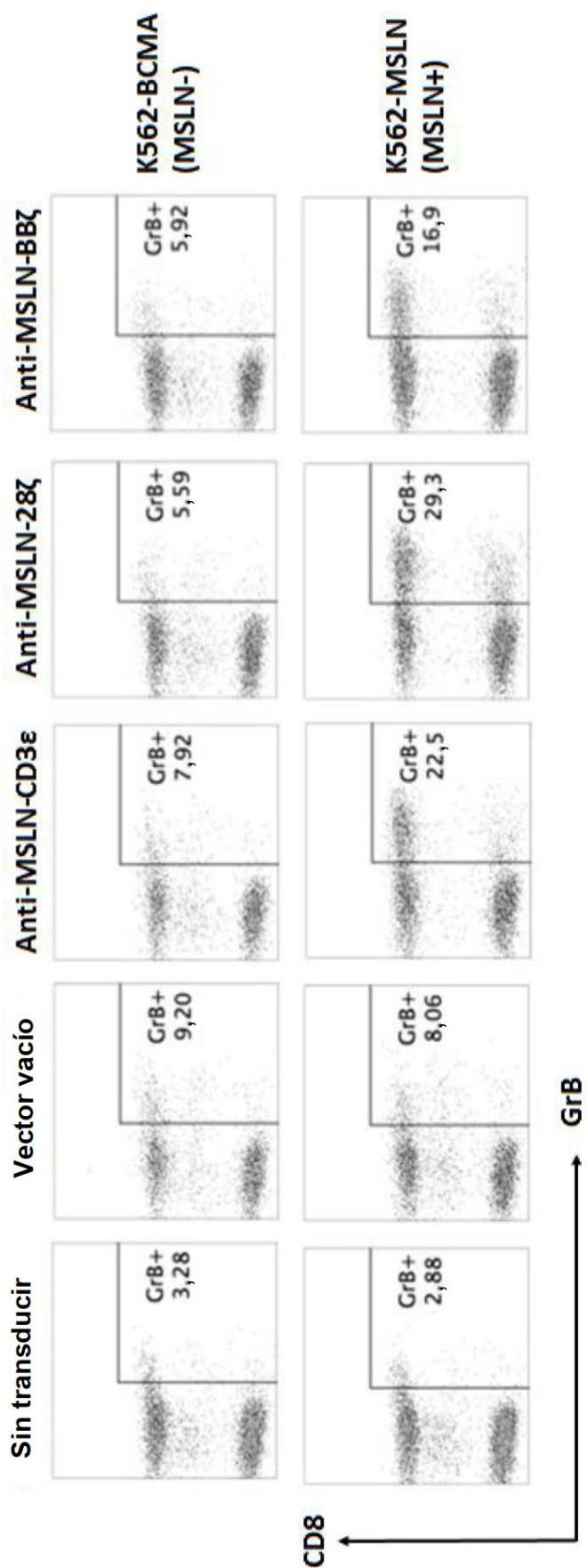
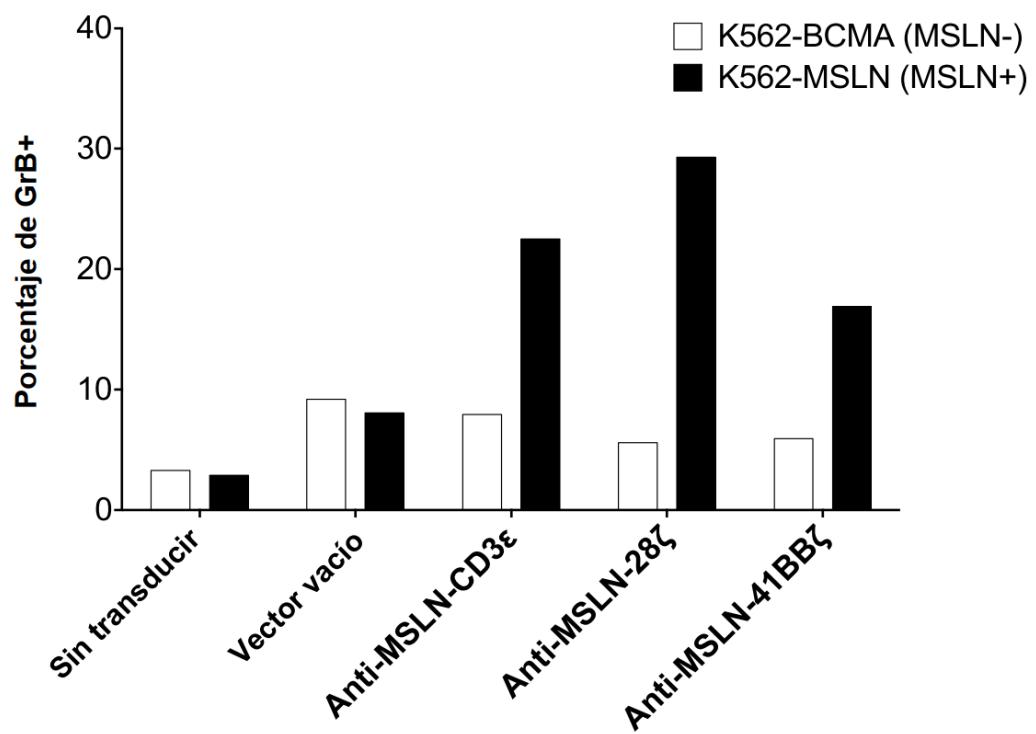


FIG. 10A

**FIG. 10B**

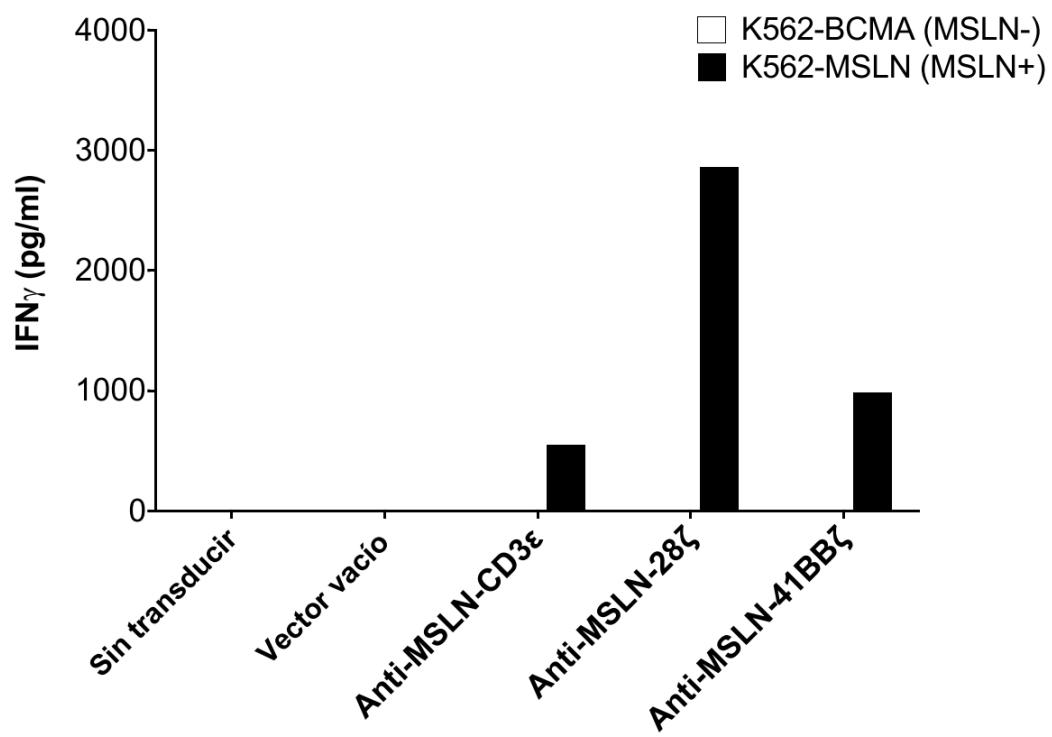


FIG. 11A

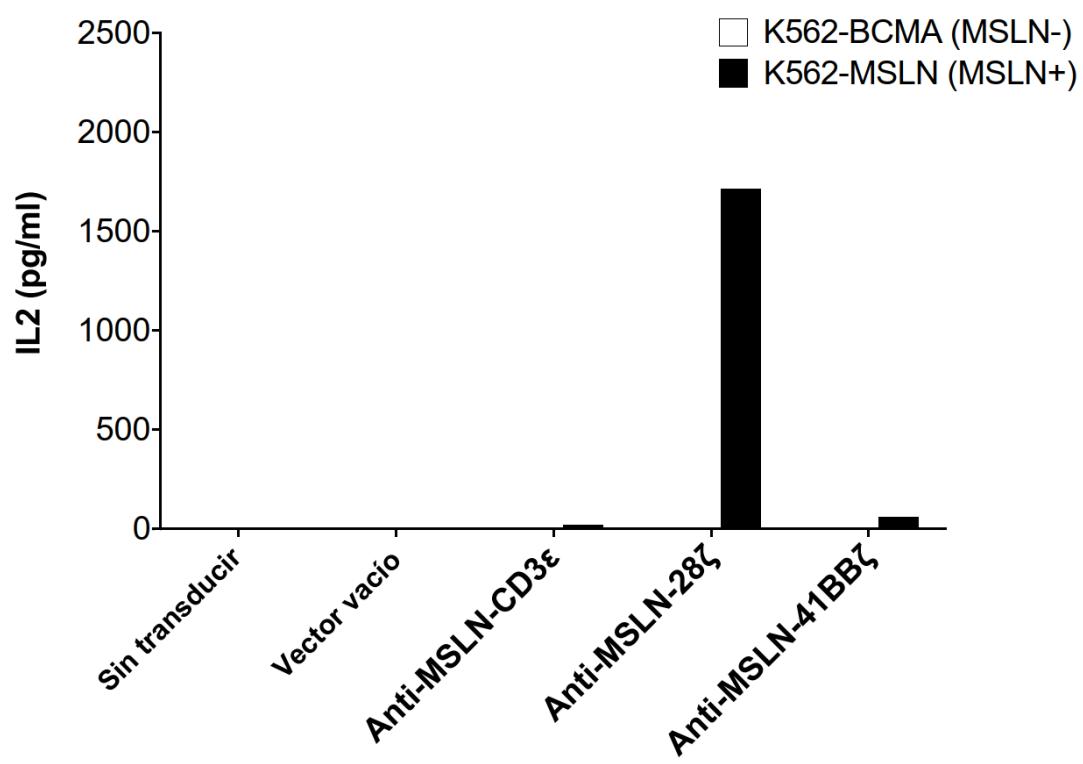
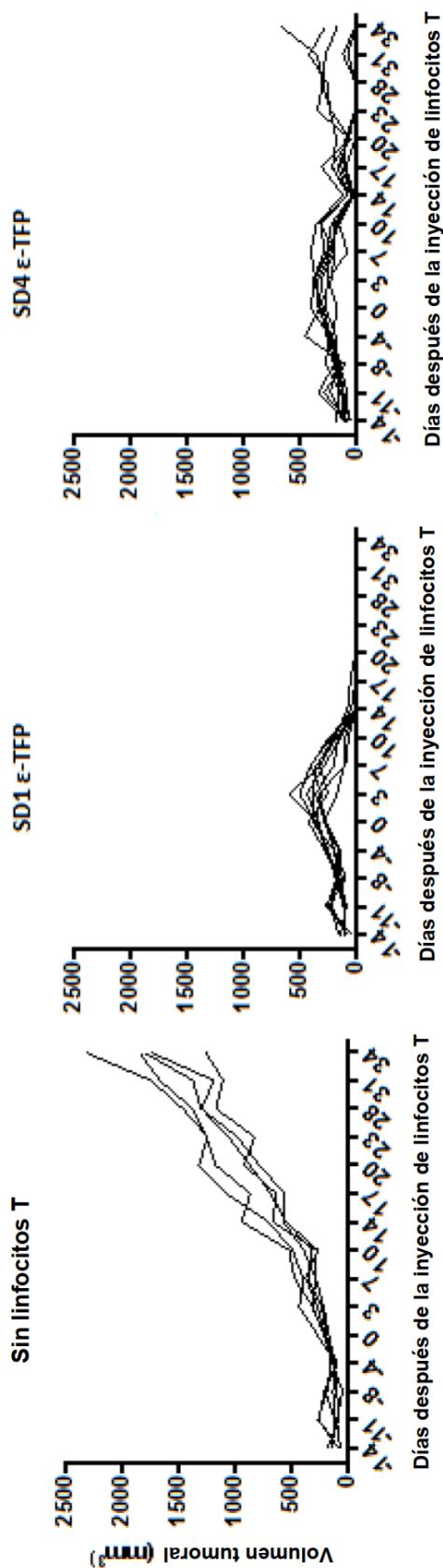
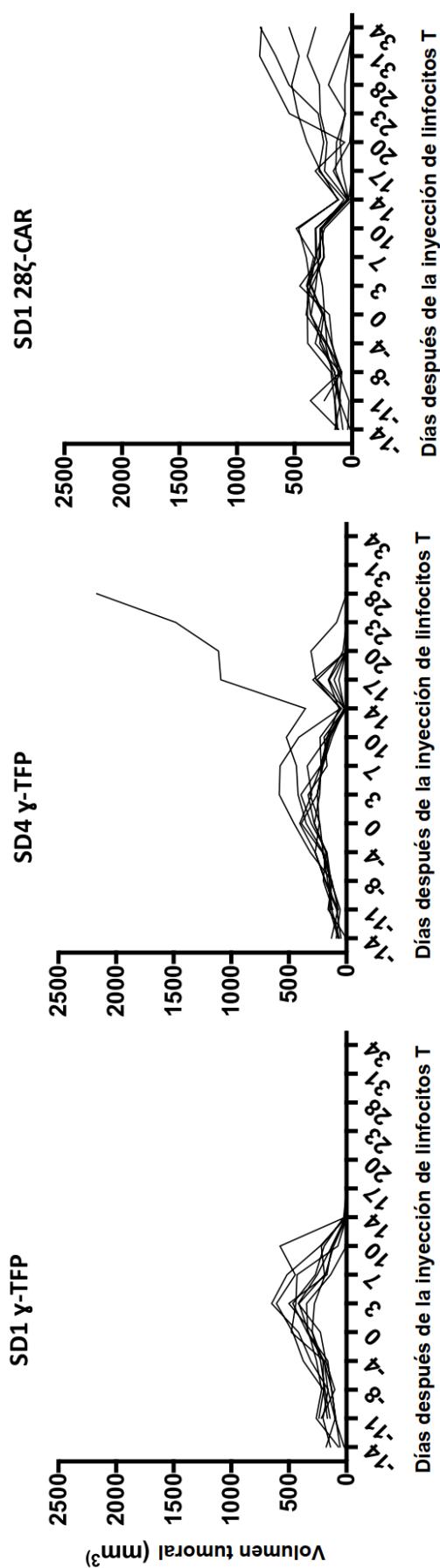


FIG. 11B





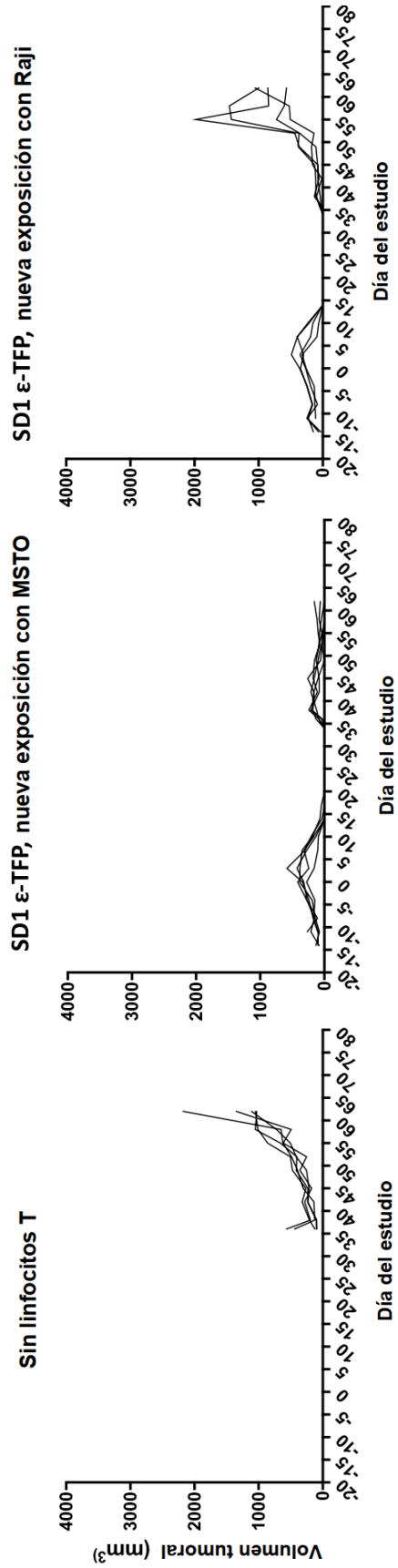


FIG. 12C

SD1 γ -TFP, nueva exposición con MSTO

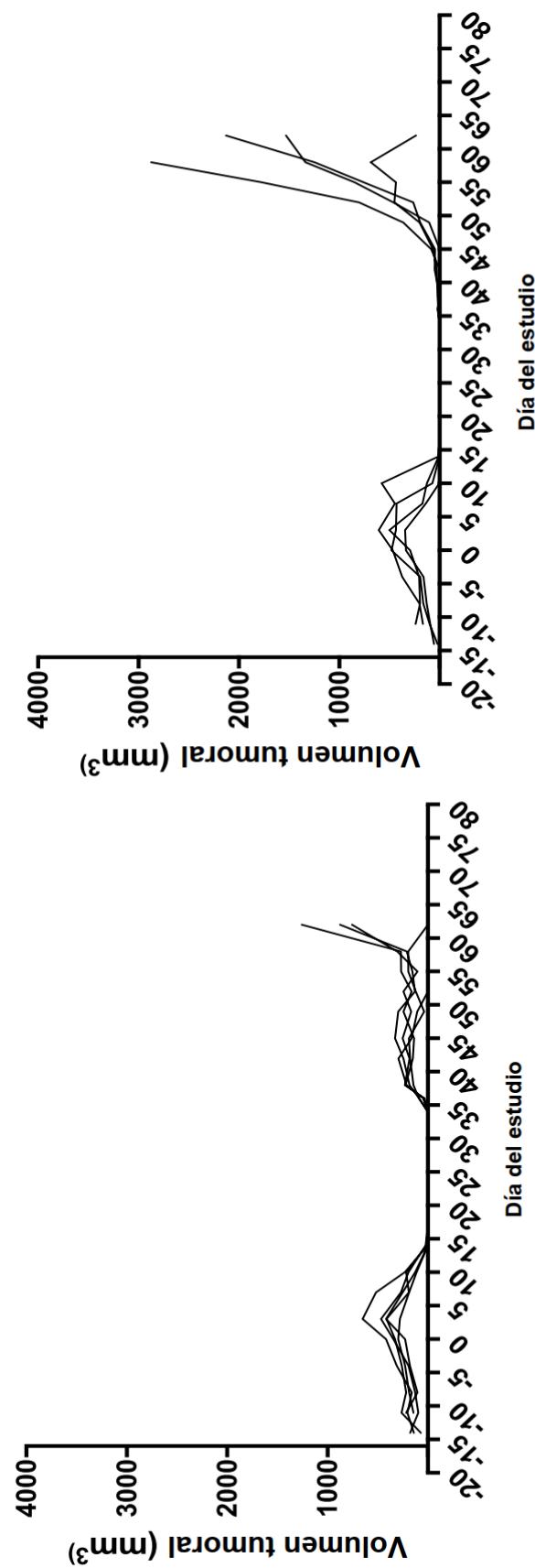


FIG. 12D

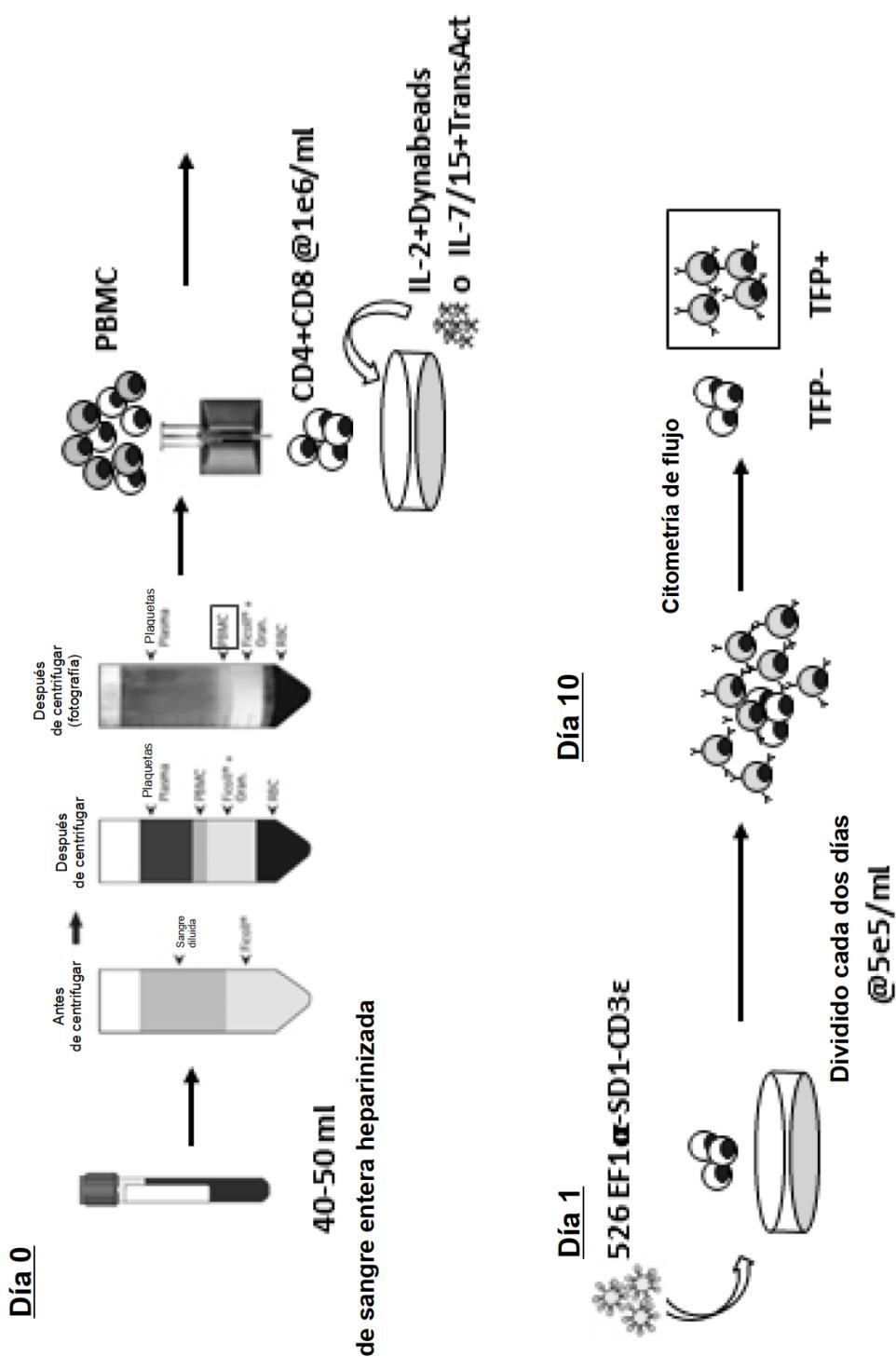


FIG. 13A

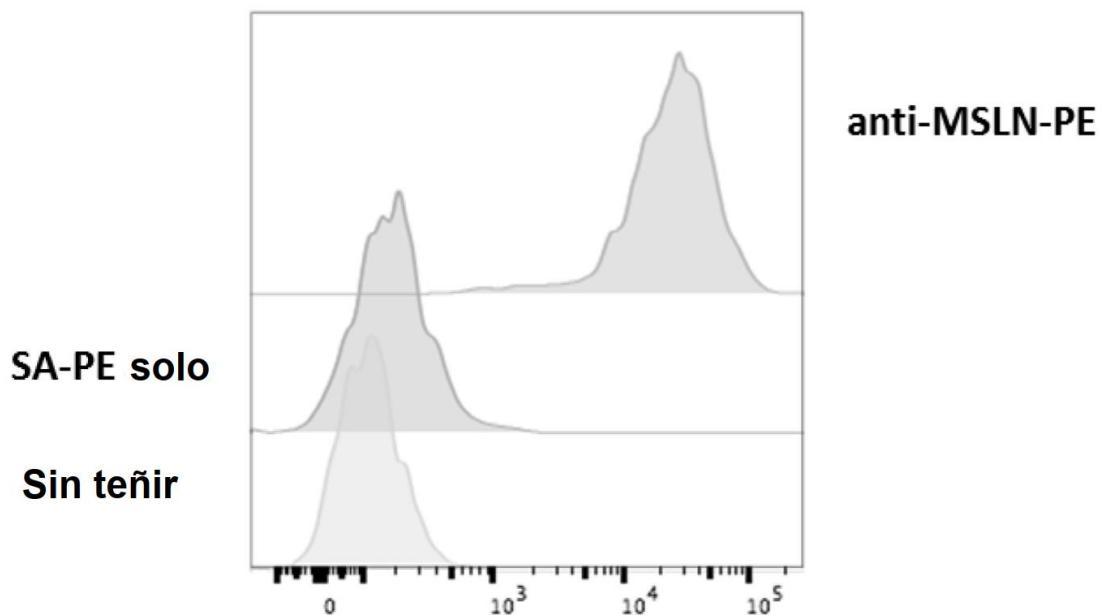


FIG. 13B

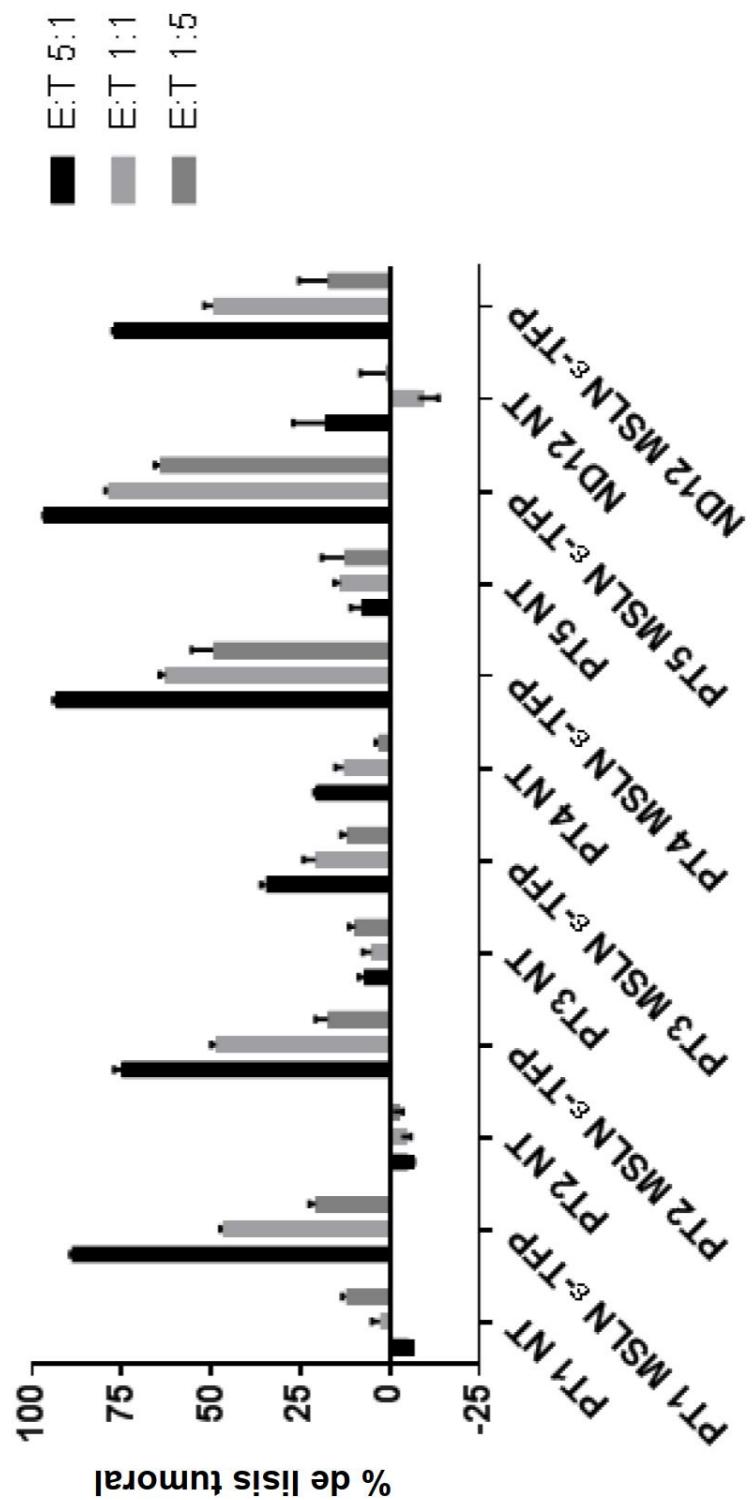


FIG. 13C

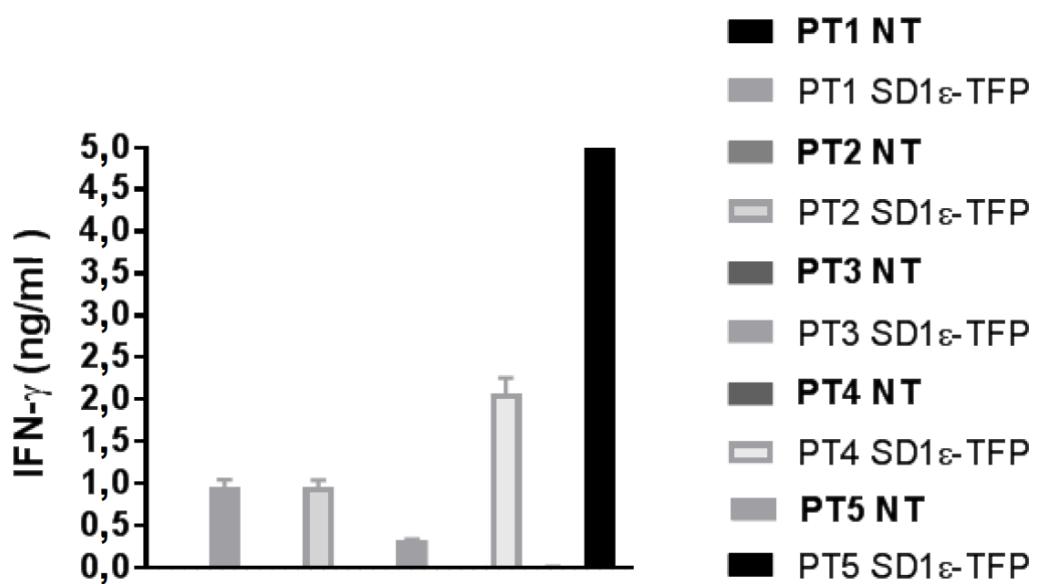


FIG. 13D

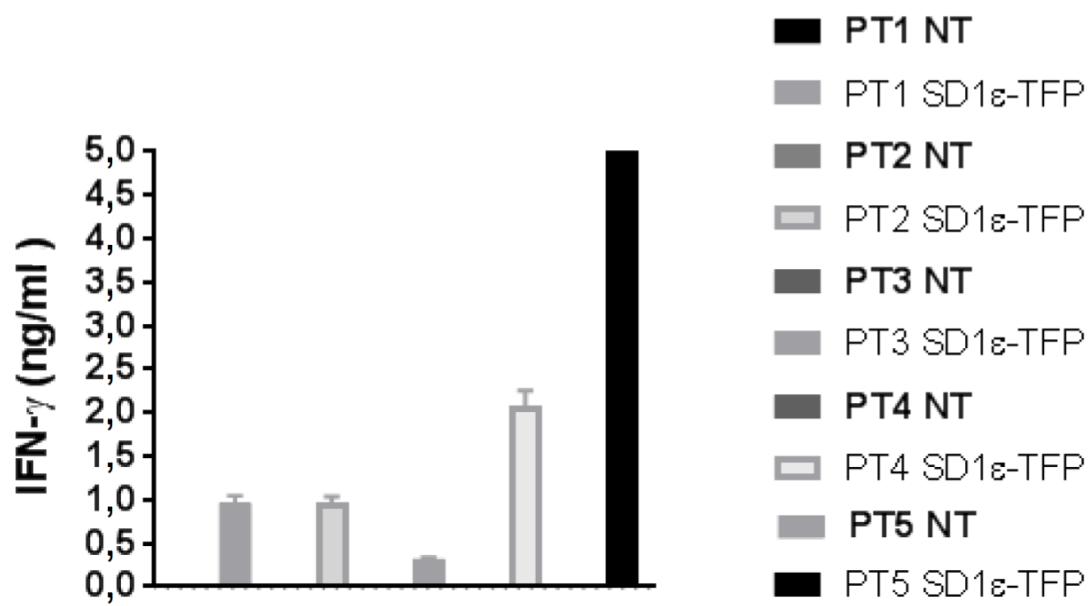


FIG. 13E

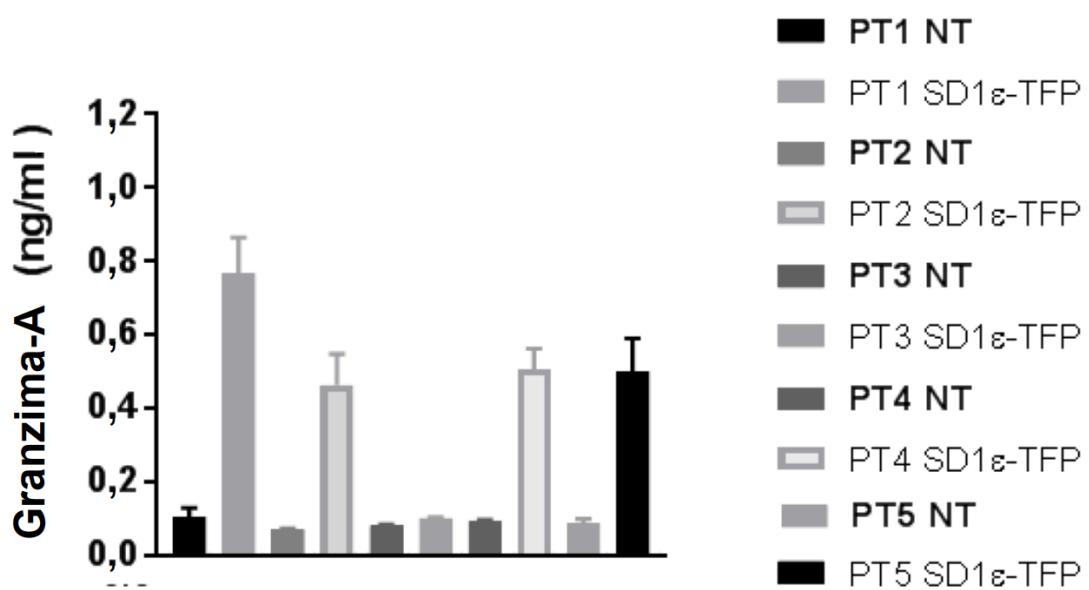


FIG. 13F

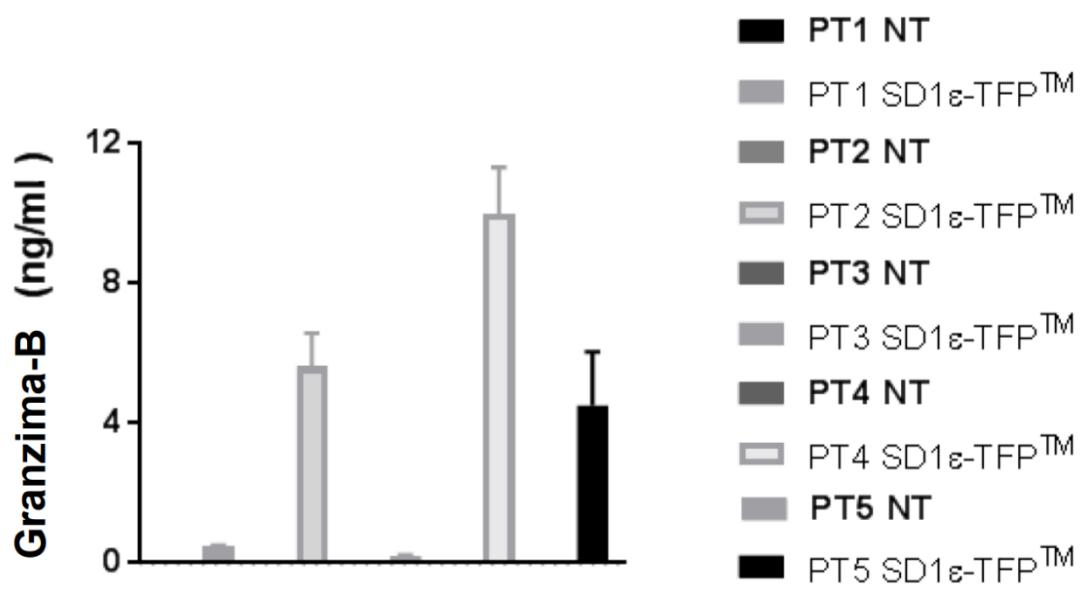


FIG. 13G

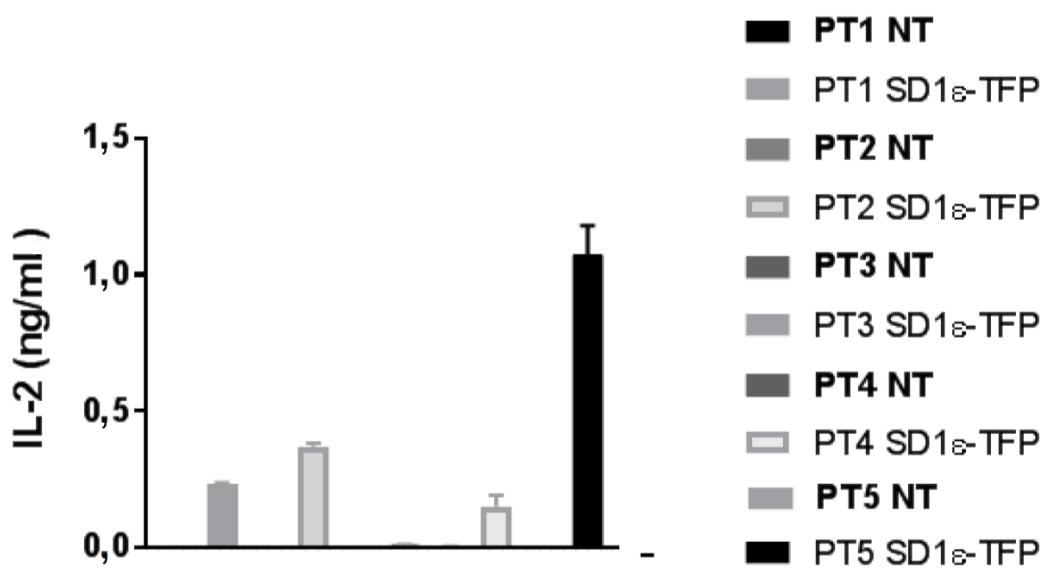


FIG. 13H

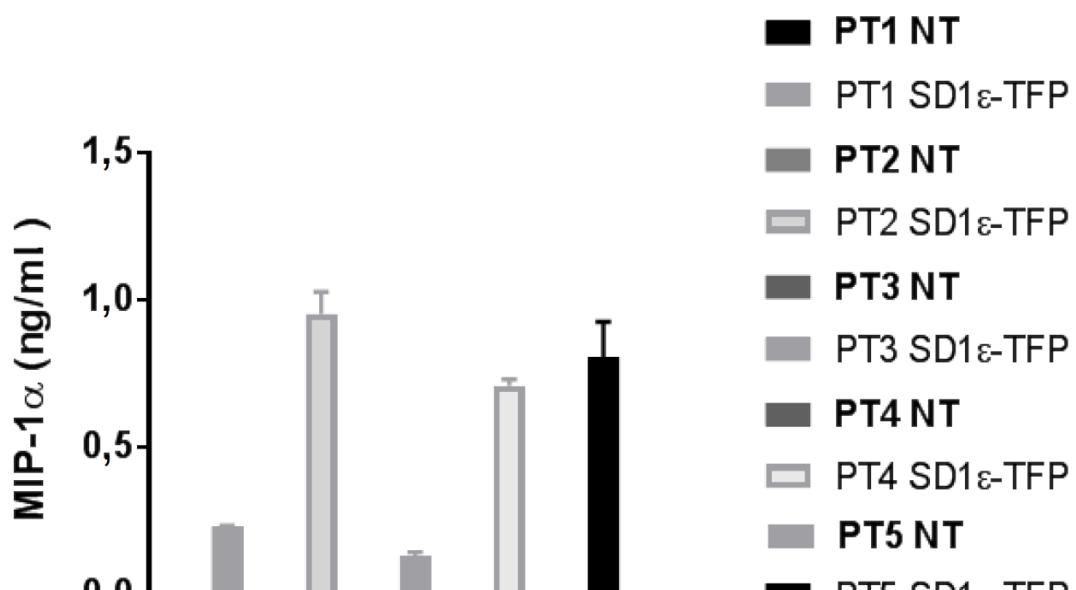


FIG. 13I

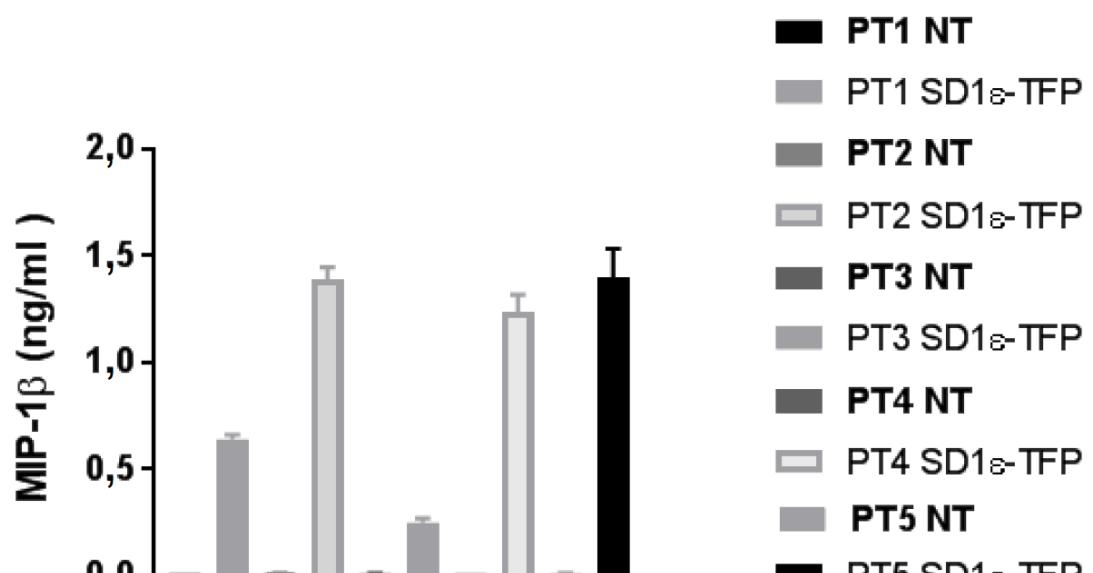


FIG. 13J

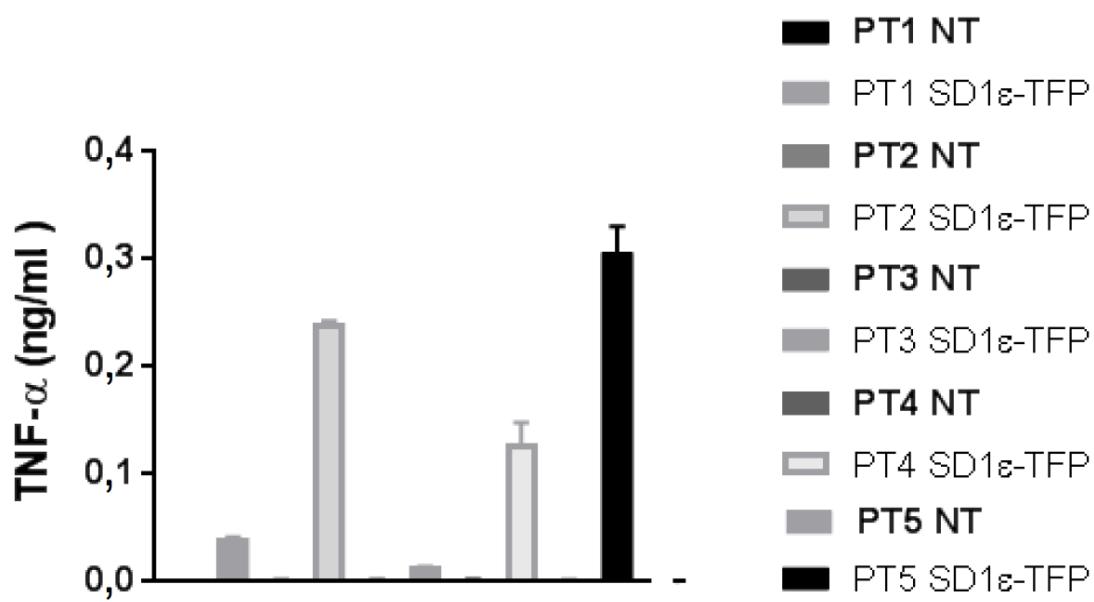


FIG. 13K

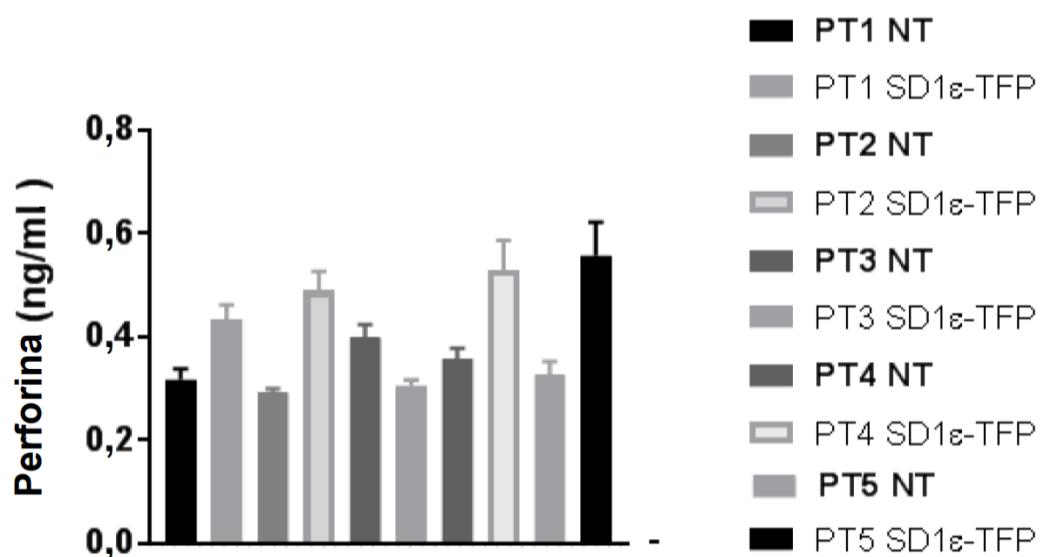
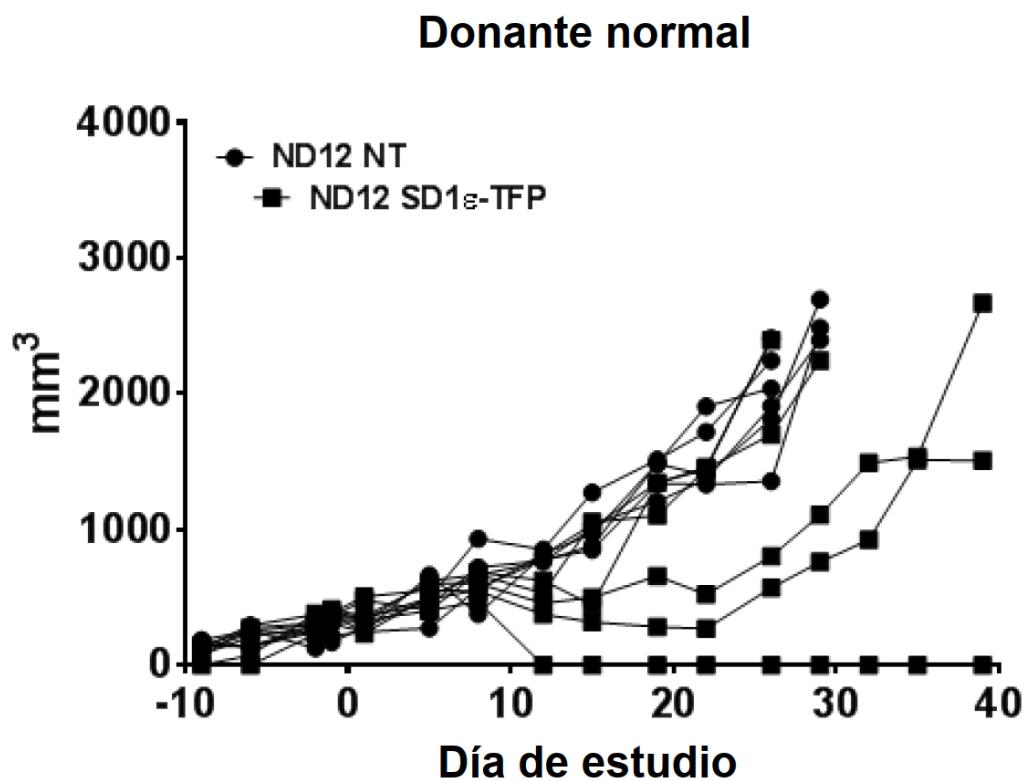


FIG. 13L

**FIG. 14A**

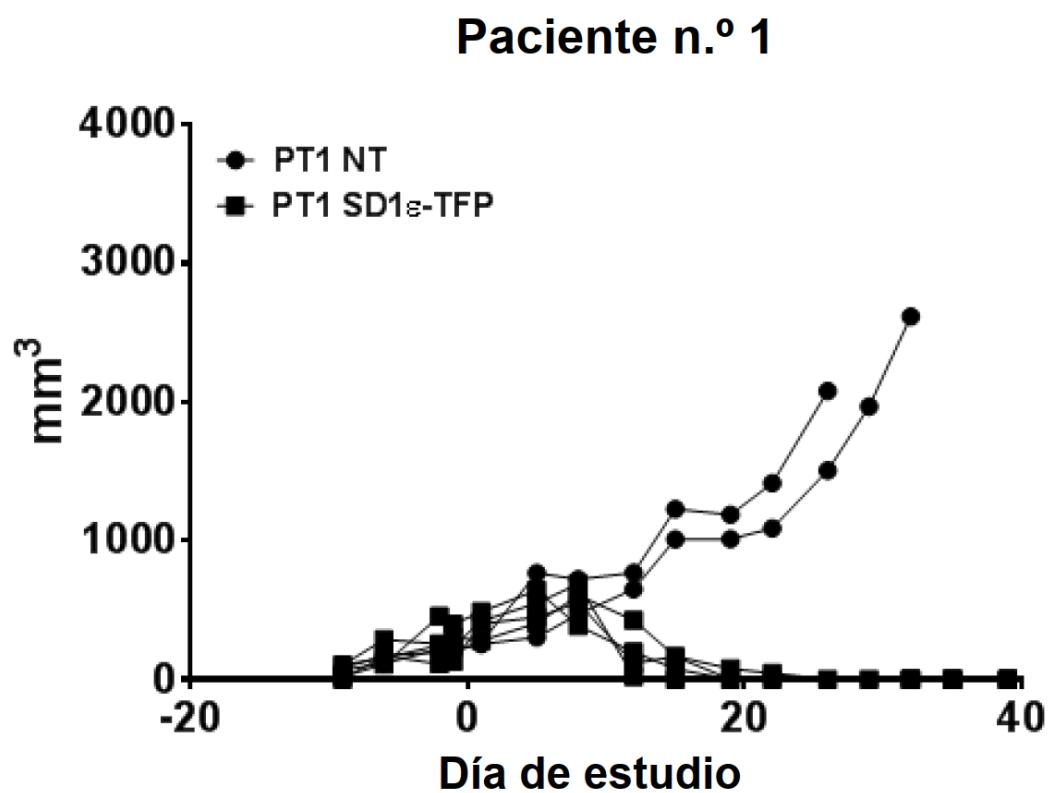


FIG. 14B

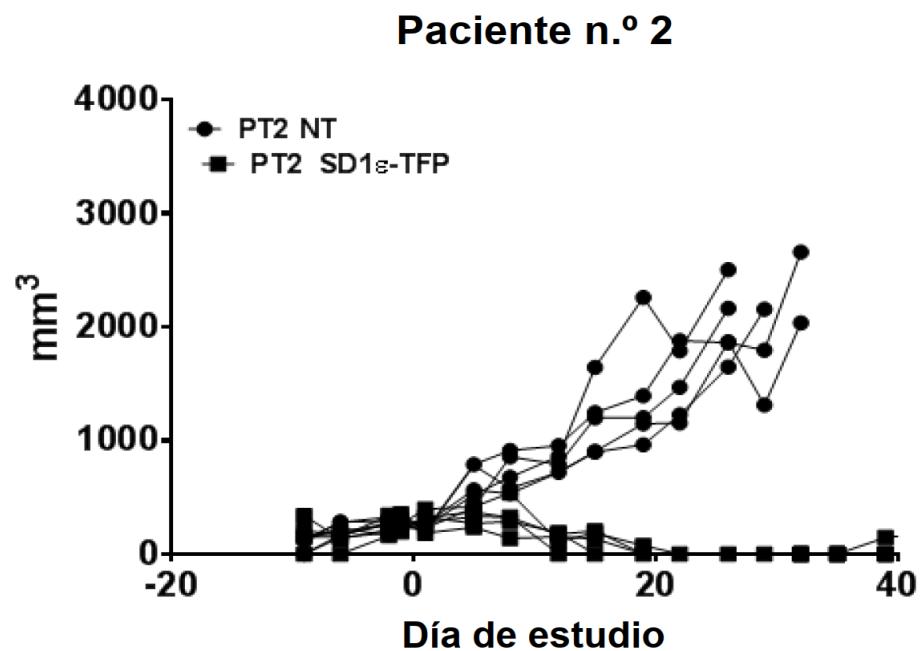


FIG. 14C

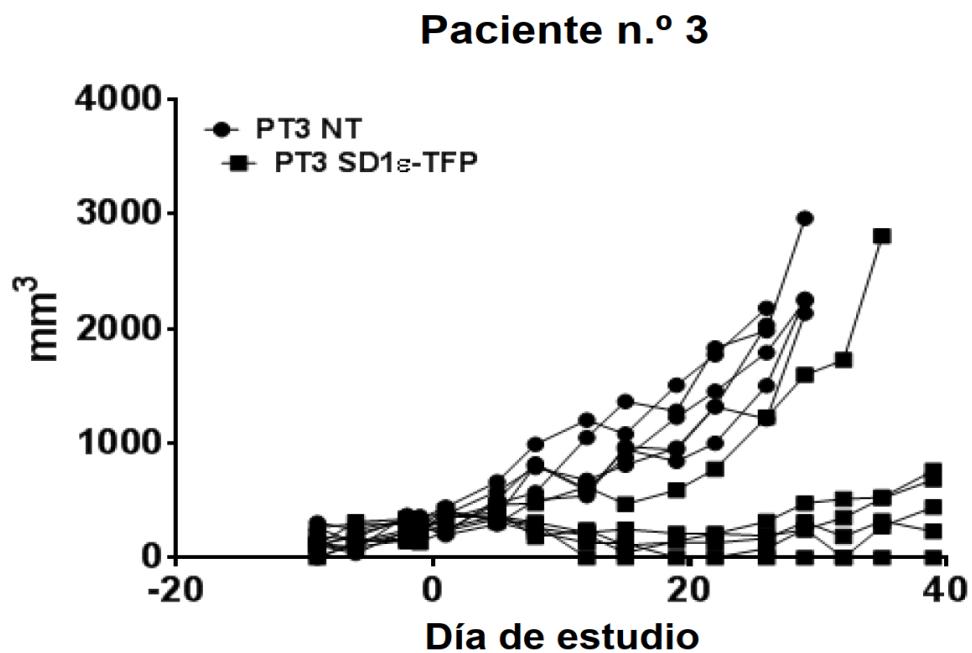


FIG. 14D

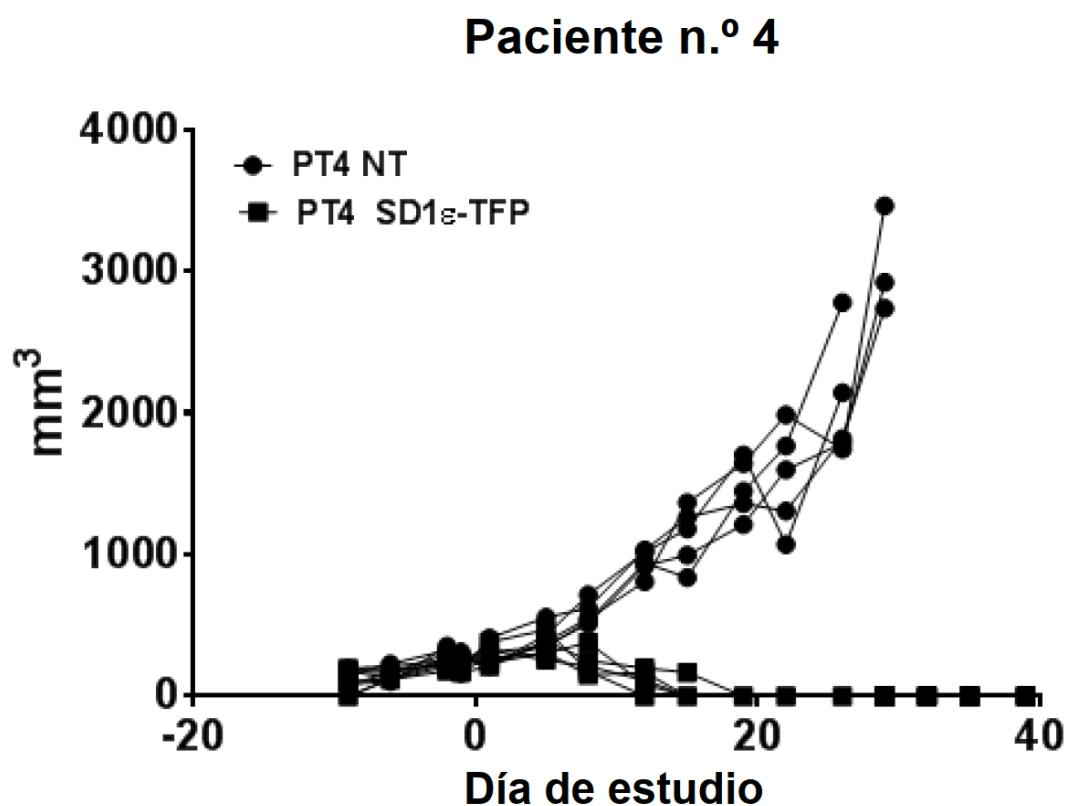


FIG. 14E