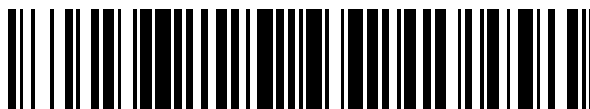


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 953**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2015** **PCT/US2015/034552**
87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015** **WO15188141**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2015** **E 15803100 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 3151854**

54 Título: **Receptores de antígeno quimérico dirigidos a mesotelina y usos de los mismos**

30 Prioridad:

06.06.2014 US 201462008851 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2020

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)
Office of Technology Transfer, National Institutes
of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325,
MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US y
MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ADUSUMILLI, PRASAD, S.;
SADELAIN, MICHEL;
DIMITROV, DIMITER, S. y
FENG, YANG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 791 953 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígeno quimérico dirigidos a mesotelina y usos de los mismos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 62/008.851, presentada el 6 de junio de 2014.

Información sobre la subvención

Esta invención se realizó con apoyo del gobierno con los n.ºs de subvención W81XWH-11-1-0783 y W81XWH-12-1-0230 del Departamento de Defensa. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

Introducción

El contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos y composiciones para mejorar la respuesta inmunitaria frente a cánceres y patógenos. Se refiere a los receptores de antígeno quimérico (CAR) que se dirigen específicamente a la mesotelina humana y a las células inmunorreactivas que comprenden tales CAR. Los CAR dirigidos a mesotelina dados a conocer actualmente tienen propiedades inmunoactivadoras mejoradas, que incluyen actividad antitumoral, a la vez que poseen características para minimizar la toxicidad e inmunogenicidad inducida por CAR.

Antecedentes de la invención

La inmunoterapia basada en células es una terapia con potencial curativo para el tratamiento del cáncer. Las células T y otras células inmunitarias pueden modificarse para dirigirse a antígenos tumorales a través de la introducción de material genético que codifica para receptores artificiales o sintéticos para el antígeno, denominados receptores de antígeno quimérico (CAR), específicos para antígenos seleccionados. La terapia dirigida de células T usando CAR ha demostrado un éxito clínico reciente en el tratamiento de algunos tumores malignos hematológicos. Sin embargo, traducir la terapia con células T que expresan CAR a tumores sólidos plantea varios obstáculos que deben superarse para lograr un beneficio clínico. Las células malignas se adaptan para generar un microentorno inmunosupresor para protegerse del reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Este microentorno tumoral plantea un desafío para los métodos de tratamiento que implican la estimulación de una respuesta inmunitaria, tal como las terapias dirigidas con células T. Los tumores sólidos también pueden estar restringidos dentro de compartimientos anatómicos que impiden el tráfico eficaz de células T, carecen de expresión de ligandos coestimuladores agonistas y/o expresan reguladores negativos de la función de células T. Por tanto, la eliminación exitosa de tumores sólidos requiere una infiltración tumoral eficaz y la superación de la inmunosupresión inducida por el tumor. Además, los tumores sólidos representan un desafío para seleccionar dianas inmunitarias óptimas, antígenos cuyo direccionamiento permitiría la erradicación del tumor por células T potentes, con una toxicidad mínima o tolerable para los tejidos no tumorales. Por consiguiente, se necesitan estrategias terapéuticas novedosas para diseñar CAR para tratar cánceres, en particular, tumores sólidos, estrategias que pueden inducir una potente erradicación tumoral con mínima toxicidad e inmunogenicidad (la inmunogenicidad de CAR puede dar como resultado una eficacia reducida o una toxicidad aguda ejemplificada en el contexto de respuesta anafiláctica a CAR subóptimos).

El documento WO2013/063419A2 da a conocer un receptor de antígeno quimérico dirigido a mesotelina (CAR).

El documento US2014/099340 A1 da a conocer un CAR dirigido a la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

El documento Wang *et al.*, Cancer Immunology Research, col. 2 n.º 2 2013, páginas 154-166 da a conocer un CAR dirigido a FAP.

Sumario de la invención

El contenido dado a conocer actualmente proporciona generalmente receptores de antígeno quimérico (CAR) que se dirigen específicamente a mesotelina humana, células inmunorreactivas que comprenden tales CAR, y usos de estos CAR y células inmunorreactivas para tratar cánceres, infecciones por patógenos, etc.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), en el que el scFv comprende:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12, una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:13, una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:14, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:16.

En una realización de la invención, el dominio de unión a antígeno extracelular, del CAR reconoce mesotelina humana con un nivel de expresión de mesotelina de aproximadamente 1.000 o más sitios de unión a mesotelina/célula.

- 5 En una realización de la invención, el dominio de unión a antígeno extracelular se une específicamente a mesotelina humana con una afinidad de unión de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM. En algunas realizaciones de la invención, el scFv comprende una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO:1, y/o una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:5 o aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:3 y opcionalmente en el que el scFv comprende: (a) una
10 región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO:1; y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:5; o (b) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO:1; y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO: 3.

- 15 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una célula inmunorreactiva que comprende el CAR tal como se da a conocer actualmente.

- Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una célula inmunorreactiva según la invención para su uso en la reducción de la carga tumoral en un sujeto, el aumento o alargamiento de la supervivencia de un sujeto que tiene una neoplasia, el aumento de la producción de citocinas inmunoactivadoras en respuesta a una célula cancerosa o un patógeno en un sujeto, la prevención o tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto o la
20 prevención del rechazo de injerto en un sujeto que es un receptor de un trasplante de órgano.

- Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una célula inmunorreactiva que se une a mesotelina humana, que comprende introducir en la célula inmunorreactiva una secuencia de ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), en el que el scFv comprende:
25 una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:13, una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:14, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:16.

- 30 Según un quinto aspecto de la invención se proporciona un ácido nucleico que codifica para el CAR tal como se da a conocer.
- 35 Según un sexto aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico tal como se da a conocer y opcionalmente en el que el vector es un vector $\square$ -retroviral.

- Según un séptimo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la célula inmunorreactiva de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente que es para tratar una neoplasia, y opcionalmente en la que la neoplasia se selecciona del grupo que
40 consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos.

- Según un octavo aspecto de la invención, se proporciona un kit para tratar o prevenir una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad inflamatoria, un trasplante alogénico o rechazo de injerto, que comprende la célula inmunorreactiva de la invención o el ácido nucleico de la invención, y opcionalmente en el que el kit comprende además instrucciones escritas para usar la célula inmunorreactiva para tratar un sujeto que tiene una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad inflamatoria, un trasplante alogénico o rechazo de injerto; y opcionalmente en el que la neoplasia se selecciona del grupo que
45 consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos.

- En una realización específica no limitativa, el scFv es un scFv humano. En una realización, la secuencia líder comprende un polipéptido CD8. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende un polipéptido CD8, un polipéptido CD28, un polipéptido CD3 $\square$, un polipéptido CD4, un polipéptido 4-1BB, un polipéptido OX40, un polipéptido ICOS, un polipéptido CTLA-4, un polipéptido PD-1, un polipéptido LAG-3, un polipéptido 2B4, un polipéptido BTLA, un péptido sintético (no basado en una proteína asociada con la respuesta inmunitaria), o una combinación de los mismos. En una realización, el dominio transmembrana comprende un
55

polipéptido CD8. En una realización, el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD28.

Según el contenido dado a conocer actualmente, el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3□. En algunas realizaciones, el dominio intracelular comprende además al menos una región de señalización coestimuladora. En algunas realizaciones, la al menos una región de señalización coestimuladora comprende un polipéptido CD28, un polipéptido 4-1BB, un polipéptido OX40, un polipéptido ICOS, un polipéptido PD-1, un polipéptido CTLA-4, un polipéptido LAG-3, un polipéptido 2B4, un polipéptido BTLA, un péptido sintético (no basado en una proteína asociada con la respuesta inmunitaria), o una combinación de los mismos. En una realización, el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8 y el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3□. En otra realización, el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD28 y el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3□ y un dominio de señalización coestimulador que comprende un polipéptido CD28. En aún otra realización, el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8 y el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3□ y un dominio de señalización coestimulador que comprende un polipéptido 4-1BB.

En una realización, el CAR es Mz. Mz comprende un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD8, y un dominio intracelular que comprende un polipéptido CD3□. En una realización, el CAR es M28z. M28z comprende un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD28, y un dominio intracelular que comprende un polipéptido CD3□ y una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido CD28. En una realización, el CAR es MBBz. MBBz incluye un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD8, y un dominio intracelular que comprende un polipéptido CD3□ y una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido 4-1BB.

En determinadas realizaciones, el CAR se expresa de manera recombinante. El CAR puede expresarse a partir de un vector. En una realización, el vector es un vector □-retroviral.

El contenido dado a conocer actualmente también proporciona células inmunorreactivas aisladas que comprenden los CAR descritos anteriormente. En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva aislada comprende además al menos un ligando coestimulador exógeno. En algunas realizaciones, el al menos un ligando coestimulador se selecciona del grupo que consiste en 4-1BBL, CD80, CD86, CD70, OX40L, CD48, TNFRSF14, y combinaciones de los mismos. En una realización, el ligando coestimulador es 4-1BBL. En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva aislada comprende además al menos una citocina exógena. En algunas realizaciones, la al menos citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21, y combinaciones de las mismas. En una realización, la citocina es IL-12. En algunas realizaciones, la célula inmunorreactiva aislada se selecciona del grupo que consiste en una célula T, un linfocito citotóxico natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL), una célula T reguladora, una célula madre embrionaria humana, y una célula madre pluripotente de la cual pueden diferenciarse células linfoides. En una realización, la célula es una célula T. En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva expresa de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4 números de copias de vector/célula del CAR. En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva aislada comprende además un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un antígeno diferente de mesotelina humana. El antígeno puede ser un antígeno tumoral o de patógeno. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en anhidrasa carbónica IX (CAIX), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, un antígeno de una célula infectada por citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, un antígeno de superficie celular), glicoproteína 2 epitelial (EGP 2), glicoproteína 40 epitelial (EGP-40), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), tirosina-proteína cinasas receptoras erb-B2,3,4, proteína de unión a folato (FBP), receptor de acetilcolina fetal (AChR), receptor a de folato, gangliósido G2 (GD2), gangliósido G3 (GD3), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), subunidad alfa-2 del receptor de interleucina 13 (IL-13R□2), cadena ligera □, receptor de dominio de inserto de cinasa (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), molécula de adhesión celular L1 (LICAM), familia A de antígeno de melanoma, 1 (MAGE-A1), mucina 16 (Muc-16), mucina 1 (Muc-1), ligandos de NKG2D, antígeno de cáncer de testículo NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), factor de crecimiento endotelial vascular R2 (VEGF-R2), proteína tumoral de Wilms (WT-1), receptor transmembrana de tirosina-proteína cinasa de tipo 1 (ROR1), y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la célula inmunorreactiva expresa una o más moléculas de adhesión. La molécula de adhesión puede aumentar la avidéz del CAR. En algunas realizaciones, la molécula de adhesión se selecciona del grupo que consiste en CD2, VLA-4, y combinaciones de los mismos.

Además, el contenido dado a conocer actualmente proporciona diversos métodos de uso de la célula inmunorreactiva descrita anteriormente. Por ejemplo, el contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos de reducción de la carga tumoral en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto, induciendo de ese modo muerte de la célula tumoral en el sujeto. En una realización, el método reduce el número de células tumorales. En otra realización, el método reduce el tamaño tumoral. En aún otra realización, el método erradica el tumor en el sujeto. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor sólido. En algunas realizaciones, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, tumor pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico,

carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos.

El contenido dado a conocer actualmente también proporciona métodos para aumentar o alargar la supervivencia de un sujeto que tiene neoplasia, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto, aumentando o alargando de ese modo la supervivencia del sujeto. En determinadas realizaciones, la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos. El método puede reducir o erradicar la carga tumoral en el sujeto.

Además, el contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos para aumentar la producción de citocinas inmunoactivadoras en respuesta a una célula cancerosa o un patógeno en un sujeto, en donde el método comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto. En determinadas realizaciones, la citocina inmunoactivadora se selecciona del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, factor 7 regulador de interferón (IRF7), y combinaciones de los mismos.

Según el contenido dado a conocer actualmente, los diversos métodos descritos anteriormente pueden comprender administrar al menos un agente inmunomodulador. En determinadas realizaciones, el al menos un agente inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en agentes inmunoestimuladores, agentes de bloqueo inmunitario de punto de control, agentes de radioterapia, agentes de quimioterapia, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los agentes inmunoestimuladores se seleccionan del grupo que consiste en IL-12, un anticuerpo monoclonal coestimulador agonista, y combinaciones de los mismos. En una realización, el agente inmunoestimulador es IL-12. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal coestimulador agonista se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-4-1BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-ICOS, y combinaciones de los mismos. En una realización, el anticuerpo monoclonal coestimulador agonista es un anticuerpo anti-4-1BB. En algunas realizaciones, los agentes de bloqueo inmunitario de punto de control se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-CTLA-4, anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7-H3, anticuerpos anti-TIM3, y combinaciones de los mismos. En una realización, el agente de bloqueo inmunitario de punto de control es un anticuerpo anti-PD-L1. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva se administra por vía pleural al sujeto.

El contenido dado a conocer actualmente también proporciona métodos para producir una célula inmunorreactiva que se une a mesotelina humana. En un ejemplo no limitativo, el método comprende introducir en la célula inmunorreactiva una secuencia de ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular se une específicamente a mesotelina humana con una afinidad de unión de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM. En una realización específica no limitativa, el dominio de unión a antígeno extracelular es un scFv. En una realización específica no limitativa, el dominio de unión a antígeno extracelular es un Fab, que se reticula opcionalmente. En una realización específica no limitativa, el dominio de unión extracelular es un F(ab)₂. En una realización específica no limitativa, cualquiera de las moléculas anteriores puede estar comprendida en una proteína de fusión con una secuencia heteróloga para formar el dominio de unión a antígeno extracelular.

El contenido dado a conocer actualmente proporciona además ácidos nucleicos que codifican para los CAR dados a conocer actualmente, y vectores que comprenden los ácidos nucleicos. En una realización, el vector es un vector $\square$ -retroviral.

El contenido dado a conocer actualmente proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de las células inmunorreactivas dadas a conocer actualmente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan composiciones farmacéuticas para tratar una neoplasia, que comprenden una cantidad eficaz de las células inmunorreactivas dadas a conocer actualmente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos.

El contenido dado a conocer actualmente proporciona además kits para tratar o prevenir una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad inflamatoria, un trasplante alogénico o rechazo de injerto, que comprende las células inmunorreactivas dadas a conocer actualmente. También se proporcionan kits para tratar o prevenir una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad inflamatoria, un trasplante alogénico o rechazo de injerto, que comprenden ácidos nucleicos que comprenden los CAR dados a conocer actualmente. En algunas realizaciones, el kit incluye además instrucciones escritas para usar la célula inmunorreactiva para tratar un sujeto que tiene una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad inflamatoria, un trasplante alogénico o rechazo de injerto.

El contenido dado a conocer actualmente proporciona además un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto. En un ejemplo no limitativo, el método comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto. En una realización, la célula inmunorreactiva es una célula inmunoinhibidora. En una realización no limitativa, la célula inmunoinhibidora es una célula T reguladora. En una realización, la enfermedad inflamatoria es pancreatitis. En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, el sujeto es un receptor de un trasplante de órgano. En una realización específica, el sujeto es un receptor de un trasplante de páncreas.

El contenido dado a conocer actualmente proporciona además un método para prevenir el rechazo de injerto en un sujeto que es un receptor de un trasplante de órgano. En un ejemplo no limitativo, el método comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto. En una realización, la célula inmunorreactiva es una célula inmunoinhibidora. En una realización no limitativa, la célula inmunoinhibidora es una célula T reguladora. En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización, el sujeto es un receptor de un trasplante de páncreas.

Breve descripción de las figuras

La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no prevista para limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con los dibujos adjuntos.

La figura 1 representa los CAR de "segunda generación".

Las figuras 2A-F representan la función efectora *in vitro* de constructos específicos de mesotelina. (A) Generación de constructos específicos de mesotelina. Los constructos anti-mesotelina contienen o bien el endodominio CD3 solo (Mz) o bien en combinación con el dominio coestimulador CD28 (M28z). Se incluyó un CAR dirigido a PSMA (P28z) con coestimulación de CD28 en experimentos como control negativo. (B) Se transducen de manera eficaz subconjuntos de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ con CAR. Los porcentajes de transducción representan la expresión de genes indicadores tal como se mide mediante citometría de flujo. Se detectaron los CAR M28z y Mz por medio de expresión de gen indicador de proteína fluorescente verde (GFP). Se detectaron células T que expresan el CAR P28z por medio de expresión de gen indicador de factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR). Se usaron células no transducidas para establecer puertas positivas después de que una tinción de células vivas/muertas excluyera células no viables. Los porcentajes CD4⁺ y CD8⁺ se notifican después de seleccionar células CAR⁺. (C) Las células T específicas de mesotelina demuestran lisis específica de antígeno. Se incubaron células T a razones efector/diana indicadas con células diana MSTO-211H cargadas con 51Cr transducidas para sobreexpresar mesotelina (MSTO MSLN⁺) y se midió la lisis de célula diana (liberación de cromo). Las barras de error representan el EEM de la media de tres réplicas. (D) La coestimulación de CD28 mejora la secreción de citocinas específicas de antígeno. Se estimularon células T transducidas con control o transducidas con Mz o M28z con bien células MSTO-211H no transducidas (sin MSTO E) o células MSTO MSLN⁺ y se midieron citocinas usando ensayo con perlas Luminex. (E) La coestimulación de CD28 facilita la acumulación robusta de células T tras la estimulación de antígeno repetida. Se cultivaron conjuntamente células T con células tumorales sin MSTO o MSTO MSLN⁺ (las flechas indican reestimulación con células tumorales recién irradiadas). A la izquierda, estimulación de antígeno sin la adición de IL-2 exógena. A la derecha, IL-2 exógena añadida (20 UI/ml). Se calcularon números de células T-CAR⁺ absolutos a los intervalos de tiempo indicados usando recuentos de hemocitómetro manuales corregidos por GFP⁺ en porcentaje determinado mediante citometría de flujo. Las barras de error representan el EEM de la media de tres réplicas. (F) Las células T transducidas con CAR específicos de mesotelina logran un fenotipo efector 62L tras estimulaciones antigénicas sucesivas. Análisis de citometría de flujo multicolor en serie de células T-CAR⁺ tras cada estimulación de antígeno.

Las figuras 3A-E representan la erradicación de tumor pleural MSLN⁺ establecido tras administración intrapleural de células T M28z. (A) El modelo de ratón de mesotelioma pleural maligno ortotópico recapitula la enfermedad humana. Fotografía e imagen de resonancia magnética de lesiones macroscópicas en ratones inyectados con 1 x 10⁵ células tumorales MSTO MSLN⁺ 5 semanas después de la inoculación de tumor (imagen superior izquierda y derecha respectivamente). Todos los ratones tienen crecimiento tumoral a lo largo de las superficies pleurales y diafragmáticas y atrapamiento de las estructuras mediastínicas. Parte inferior, tinción de hematoxilina y eosina (H&E) representativa de secciones de la pared torácica que demuestran invasión temprana de la pared torácica por el tumor (parte inferior izquierda) así como expresión de mesotelina sostenida (parte inferior derecha). (B) Obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI, *bioluminescence imaging*) del tumor *in vivo* en serie de ratones NOD/SCID/γ^c null (NSG) ratones que portan tumor pleural. Las células tumorales MSTO MSLN⁺ coexpresan proteína fluorescente verde/proteína de fusión de luciferasa de luciérnaga (GFP/Luc) para permitir la obtención de imágenes. Tras el establecimiento del tumor intrapleural, los ratones se trataron con transferencia adoptiva de o bien 3 x 10⁶ linfocitos T M28z por vía intravenosa o bien 3 x 10⁵ linfocitos T M28z (una dosis 10 veces menor) por vía intrapleural, y 3 x 10⁵ células T que portan el receptor de antígeno quimérico de direccionamiento a PSMA humano P28z se inyectaron por vía pleural como control negativo. Se muestran 4 ratones representativos de cada grupo. Se obtuvieron imágenes de los ratones tanto de manera ventral como dorsal. Se muestran intensidades de señal de BLI en fotones/segundo. (C) La señal tumoral de BLI cuantificada por animal cada semana a lo largo de un periodo de 100 días. Cada línea corresponde a un animal, representando cada punto el recuento de fotones promedio de la adquisición ventral y dorsal por animal en un punto de tiempo dado. (D) El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier

que compara células T M28z administradas por vía intravenosa (n=4, línea discontinua de color azul) tienen supervivencia disminuida en comparación con células T M28z⁺ administradas por vía intrapleural (n=7, línea de color azul) (92d frente a nd, p= 0,02). Resultados confirmados en múltiples experimentos de repetición. (E) Tratamiento de animales después de la inoculación tumoral.

5 Las figuras 4A-F representan una acumulación robusta dependiente de antígeno tumoral *in vivo* de células T M28z⁺ administradas por vía pleural. (A) BLI comparativa de células T *in vivo* de células T transferidas de manera adoptiva en ratones NSG que portan tumor MSTO MSLN⁺ en de 0 a 10 d después de la administración pleural o intravenosa de 1×10^6 células T transducidas conjuntamente con luciferasa de luciérnaga mejorada (effLuc)(vector mostrado en la parte superior) y CAR M28z. Se administraron células T 1 semana después de la inyección intrapleural de 1×10^6 células tumorales MSTO MSLN⁺. Se muestra un ratón representativo por grupo (n=3-4). (B) Intensidades de señal de luciferasa effLuc de BLI secuencial después de la transferencia de células T durante un periodo de 10 d. Cada línea representa la señal promedio de 3-4 ratones, mostrando cada punto el recuento de fotones promedio de la adquisición ventral y dorsal por animal por grupo en un punto de tiempo dado. En particular, las células T M28z effLuc⁺ administradas por vía pleural presentan una luminiscencia aumentada y sostenida en comparación con células T M28z effLuc⁺ administradas por vía intravenosa que muestran retención pulmonar inicial y emisión de señales retardada dentro del tumor en la cavidad pleural. (C) Análisis de citometría de flujo multicolor de una suspensión células individuales tumorales preparada a partir de animales representativos 3 d después de la administración de células T M28z o bien pleural o bien intravenosa. Se tiñeron las células con anticuerpos para CD3 humano y se determinó la positividad a CAR mediante la expresión indicadora de GFP, el análisis adicional incluyó CD4/CD8/CD62L/CD45RA. (D) Inmunohistoquímica de células T M28z. (E) Números absolutos de células T M28z que infiltran el tumor (recuentos celulares totales usando perlas brillantes). Los gráficos de barras mostrados representan la media $\pm$ EEM de tres ratones por grupo que muestran una acumulación robusta de células T M28z 7 días tras la administración pleural. Los ratones tratados con células T por vía intravenosa a la misma dosis demuestran menos acumulación dentro del tumor pleural. (F) Números absolutos de células T M28z que infiltran el tumor en el bazo 3 días y 7 días tras la administración pleural.

Las figuras 5A-C representan coestimulación de CD28 que mejora la persistencia y eficacia de células T-CAR⁺ *in vivo*. (A) La coestimulación de CD28 mejora la eficacia de células T-CAR⁺ tal como se mide mediante la mediana de supervivencia y facilita la erradicación del tumor tras una única dosis de células T. Se administraron por vía pleural 1×10^5 células T-CAR⁺ Mz, M28z o P28z (control negativo) en ratones que portan tumores MSTO MSLN⁺ GFP/Luc⁺ pleurales establecidos. Se midió la carga tumoral a la semana mediante BLI. A la izquierda, curva de supervivencia de Kaplan Meier. Se determinó la significación estadística que compara la mediana de supervivencia de grupos Mz y M28z (al menos 9 ratones por grupo) usando una prueba de rangos logarítmicos. A la derecha, la carga tumoral tal como se cuantifica mediante BLI para cada ratón individual usando unidades de fotones por segundo. (B) La coestimulación de CD28 mejora la persistencia de células T-CAR⁺. Se muestran células T-CAR⁺ absolutas por ml de sangre periférica a los 40 y 50 d tras la administración pleural de 3×10^6 células T-CAR⁺. Los gráficos de barras mostrados representan la media $\pm$ EEM de tres ratones. Se realizaron pruebas de la t, y se determinó la significación estadística usando una corrección de Bonferroni para múltiples correcciones. *p<0,05. (C) Las células T-CAR⁺ persistentes son predominantemente CD4⁺. A la izquierda, análisis de citometría de flujo multicolor representativo de sangre periférica en ratones tratados con células T-CAR o bien Mz o bien M28z. La estrategia de selección muestra la puerta de linfocitos y la puerta de células T CD3⁺CD45⁺ después de la retirada de células muertas. Para cada ratón, se realizó análisis de fenotipo CD4⁺ y CD8⁺ después de seleccionar células vivas, células T CD3⁺CD45⁺ y células T GFP⁺ (CAR⁺). A la derecha, gráficos de barras que representan razones CD4:CD8 determinadas usando análisis de citometría de flujo en serie de sangre periférica extraída en puntos de tiempo sucesivos tras la administración de células T. La razón CD4:CD8 de infusión previa fue aproximadamente 0,5 para todos los experimentos *in vivo*. Los resultados se muestran similares a lo largo de un intervalo de dosis de células T (3×10^6 , 1×10^6 y 3×10^5 CAR⁺). Las pruebas de la t que comparan las razones de CD4⁺ con respecto a CD8⁺ medias (n=3 en cada punto de tiempo) demostraron significación estadística (después de la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones) a d 30, 40 y 50 tras la infusión de células T en los ratones tratados con Mz y a d 30 y 40 para ratones tratados con M28z.

50 Las figuras 6A-E representan células T CD4⁺ CAR⁺ con coestimulación de CD28 demuestran citotoxicidad retardada pero eficaz. (A) La clasificación con perlas de selección negativa logró >98% de pureza para experimentos que analizan poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺. (B) Las células T CD4⁺ M28z muestran una citotoxicidad antitumoral similar pero retardada en comparación con células T CD8⁺ M28z. Se incubaron células T-CAR⁺ específicas de mesotelina o transducidas con control a razones efector/diana indicadas con células diana MST0211H cargadas con ⁵¹Cr transducidas para sobreexpresar mesotelina (MSTO MSLN⁺) y se midió la lisis de célula diana (liberación de cromo). Las barras de error representan el EEM de la media de tres réplicas. *p<0,05 que compara células T CD8 CAR⁺M28z con CD4 M28z. (C) La coestimulación de CD28 es necesaria para citotoxicidad óptima mediada por CD4⁺. Tras la purificación con perlas de subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺, se incubaron células T-CAR⁺ específicas de mesotelina transducidas con control a razones efector/diana indicadas con células diana MST0211H cargadas con ⁵¹Cr transducidas para sobreexpresar mesotelina (MSTO MSLN⁺) y se midió la lisis de célula diana (liberación de cromo). *p<0,05 que compara células T-CAR⁺ CD4 M28z con CD4 Mz. (D) El sobrenadante rico en citocina no provoca directamente lisis de célula tumoral. Se mezclaron sobrenadantes obtenidos tras una incubación conjunta de 18 h de CD4⁺ M28z o CD4⁺ P28z (como control negativo) con células

diana MSTO MSLN⁺ o sin MSTO con dianas marcadas con ⁵¹Cr recién sembradas y se midió la lisis de célula diana en los puntos de tiempo indicados. Las células T-CAR CD4⁺ M28z demostraron lisis específica de antígeno (control positivo). (E) Las células T-CAR⁺ secretaron citocinas que mejoran la citotoxicidad mediada por CAR⁺. Los sobrenadantes obtenidos tras la estimulación específica de mesotelina de células T-CAR⁺ CD4⁺ M28z mejoran la citotoxicidad en cultivos conjuntos de 18 h de tanto CD8M28z como CD4M28z con células diana MSTO MSLN⁺ diana. Las barras de error representan el EEM de la media de tres réplicas. *p<0,05 que compara células T-CAR⁺ con y sin sobrenadante añadido.

Las figuras 7A-D representan citotoxicidad de células T-CAR⁺ específicas de mesotelina mediante perforina/granzima. (A) La parte izquierda y central no demuestra influencia sobre la citotoxicidad en células T transducidas con M28z tras bloqueo de ligando de Fas. Se cultivaron conjuntamente células T CD4⁺, CD8 clasificadas y CD4/8 M28z⁺ no clasificadas en presencia del AcM anti-Fas-L NOK-1 o un AcM de control de isotipo frente a IgG1 (cada 10 ug/ml) y MSTO MSLN⁺ en ensayos de liberación de ⁵¹Cr de 18 h. La figura a la derecha muestra la susceptibilidad de células diana a muerte celular mediada por Fas L (para detalles véase la sección Métodos). *p<0,05. (B) La lisis de células T transducidas con CAR específicas de mesotelina de dianas tumorales depende de la liberación de gránulos citotóxicos. Se cultivaron conjuntamente ensayos de liberación de ⁵¹Cr a las 18 h de subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺ clasificadas y poblaciones no clasificadas de M28z o Mz transducidas con células T durante 18 h en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en presencia o ausencia del agente quelante ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA), con células tumorales MSTO MSLN⁺. *p<0,05. (C) Las células T-CAR CD4⁺ expresan granzima B tras la estimulación pero con cinética retardada cuando se compara con células T-CAR CD8⁺. Se realizaron citometría de flujo intracelular para granzimas A y B en PBMC en reposo, blastocitos estimulados con PHA y células T transducidas con CAR estimuladas con MSTO MSLN⁺ (razón 2:1 de efector con respecto a diana) (M28z, Mz y P28z como control negativo). Se estimularon las células durante 4 ó 18 h con el fin de comparar los dos puntos de tiempo a los que se evaluó la liberación de cromo en ensayos de citotoxicidad. Después de seleccionar acontecimientos de CD3⁺ y GFP⁺, se determinaron los acontecimientos positivos para granzima usando fluorescencia menos unas células teñidas. El control de isotipo de anticuerpo fue negativo para todas las cepas. A la izquierda, transferencias puntuales FACS representativas para subconjuntos de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺. A la derecha, gráficos de barras de un experimento representativo de un total de 3 experimentos totales realizados. (D) Las células T-CAR M28z expresan una mayor cantidad de granzima B que las células T-CAR Mz. Se tiñeron las células como en (c) y se muestran histogramas representativos 18 h tras la estimulación con estimulación de MSTO MSLN⁺.

Las figuras 8A y 8B representan el efecto coestimulador de CD28 de célula T-CAR⁺ específica de mesotelina está predominantemente mediado por CD4⁺. (A) La secreción de citocinas mejorada en células T M28z está principalmente mediada por CD4⁺. Se realizaron ensayos de liberación de citocinas para células T M28z y Mz clasificadas para subpoblaciones CD4⁺, CD8 (tal como se describió previamente) o una población global no clasificada. Se cultivaron conjuntamente 5 x 10⁴ células T-CAR⁺ con 5 x 10³ células diana por pocillo por triplicado en placas de fondo redondo de 96 pocillos a un volumen final de 200 µl por pocillo. Después de 20 h, se recogieron los sobrenadantes del cultivo conjunto y se realizaron ensayos de citocina usando un ensayo de detección de citocina humana múltiple para detectar IL-2, GM-CSF, TNF-α e IFN-γ (Millipore Corp.). Los datos representan la media ± EEM de los niveles de citocina en tres pocillos por citocina. (B) Capacidad de expansión de células T profunda de células T CD4⁺ M28z sin IL-2 exógena. Expansión de células T de subpoblaciones CD4⁺, CD8⁺ transducidas con M28z o con Mz o una población global no clasificada de células T cultivadas conjuntamente cada 4 d con monocapas tumorales de MSLN⁺ o MSLN⁻. Se calcularon los números absolutos de células T-CAR⁺ a los intervalos de tiempo indicados usando recuentos de hemocitómetro manuales corregidos por GFP⁺ en porcentaje determinados mediante citometría de flujo. Cada punto representa la media ± EEM de recuentos en tres pocillos.

Las figuras 9A y 9B representan células T-CAR CD4⁺ M28z que son eficaces cuando se administran solas *in vivo* y mediante eficacia mejorada cuando se comparan con células T-CAR CD8⁺ M28z. (A) Obtención de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* realizada a la semana que sigue la carga tumoral de tumores MSTO MSLN⁺ GFP/Luc⁺ inoculados en la cavidad pleural de NSG ratones (tiempo de inoculación d 0). A los 18 d tras la infusión tumoral, los ratones recibieron o bien 3 X 10⁵, 1 X 10⁵ o bien 3 X 10⁴ células T-CAR⁺ de M28z global (n=5), CD4⁺ o CD8⁺ M28z clasificados (n=7). Se inyectó un número igual de células T que expresan el CAR P28z de direccionamiento a PSMA humano en el grupo de control (n=4). Se muestran las intensidades de señal de BLI como fotones/segundo y representan el promedio de señales ventrales y dorsales. (B) Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones tratados con células T descritas en (a). Se calcularon los valores de P mostrados usando pruebas estadísticas de rangos logarítmicos. A todas las dosis las células T-CAR⁺ CD4⁺ M28z son eficaces en comparación con células T-CAR⁺ CD8⁺. La eficacia antitumoral de células T-CAR⁺ CD4⁺ es comparable con la de células T-CAR⁺ no clasificadas.

Las figuras 10A-E representan la persistencia funcional de células T redirigidas a mesotelina transferidas de manera adoptiva está mediada predominantemente por CD4⁺ y está aumentada por coestimulación de CD28. (A) Análisis de citometría de flujo multicolor de una suspensión de células individuales del bazo preparada a partir de un ratón NSG representativo (n=3) sacrificado 202 d después de que se administraran células T por vía intrapleural. 184 d después de la erradicación del tumor intrapleural MSTO MSLN⁺ establecido mediante la infusión de 3 x 10⁵ células T M28z (datos no mostrados). Las subpoblaciones de células T M28z tras la selección para acontecimientos de CAR⁺ (CD3⁺GFP⁺) muestran una predominancia de células T CD4⁺. (B) BLI *in vivo* de ratones NSG reexpuestos a tumor

MSTO MSLN⁺ y MSTO-211H-MSLN. 87 d después de la erradicación del tumor pleural tras la administración de o bien 1×10^5 células T transducidas con M28z o con Mz; se inyectaron 1×10^6 MSLN⁺ o MSLN⁻ MSTO células tumorales en la cavidad peritoneal de ratones. En los puntos de tiempo indicados, se monitorizaron células tumorales luc⁺ mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia. Se obtuvieron imágenes de tres ratones NSG por grupo de tratamiento. Cada línea representa la media $\pm$ EEM de cada grupo de ratones mostrando cada punto el recuento de fotones promedio medido a lo largo de todo el ratón tanto de manera ventral como dorsal. Dos semanas tras la reexposición tumoral en ratones inyectados con tumor peritoneal MSTO MSLN⁺, tanto las células T-CAR⁺ Mz como M28z inyectadas 87 días antes demostraron eficacia antitumoral. Las células T-CAR⁺ M28z fueron más eficaces en la reducción de carga tumoral en comparación con células T-CAR⁺ Mz. (C y D). Números absolutos de células T M28z o Mz acumulados en el bazo después de la reexposición tumoral. Los gráficos de barras mostrados representan la media $\pm$ EEM de células T transducidas del bazo de ratones NSG reexpuestos con tumor o bien MSLN⁺ (n=6) o bien MSLN⁻ (n=6) y sacrificados 16 d tras la reexposición tumoral. Solo los ratones reexpuestos tratados con células T M28z con MSTO-211H-MSLN⁺ mostraron una acumulación robusta de células T-CAR⁺ en el bazo. También se cuantificaron subpoblaciones de células T mediante citometría de flujo (véase la sección Métodos para detalles) y mostraron que la mayoría de las células T observadas en el grupo de M28z son células T CD4⁺. (E) Tratamiento de animales después de la inoculación tumoral.

Las figuras 11A y 11B representan infiltración tumoral/estromal de CD4⁺ y CD8⁺ en un microentorno tumoral rico en FoxP3 que se asocia con supervivencia prolongada. (A) Se asocia una alta infiltración de tumor de células T CD8⁺ con supervivencia prolongada incluso en presencia de FoxP3. Se incluyeron los pacientes diagnosticados con MPM epiteloide entre 1989 y 2009 en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Para cada uno de los 162 pacientes con especímenes disponibles, se revisaron todos los portaobjetos con H&E (mediana 9, intervalo 1-43). Se seleccionaron bloques representativos para construir una micromatriz tisular (TMA) tomando 9 núcleos representativos (0,6 mm) de cada bloque tumoral del paciente y garantizando al menos 6 núcleos tumorales completos. Se cortaron secciones de cinco micrómetros de la TMA y se tiñeron mediante anticuerpos específicos (CD8: anticuerpo monoclonal de ratón, Dako, dilución 1:200, FoxP3: anticuerpo monoclonal de ratón, Abcam, dilución 1:2.000). La clasificación de intensidad de CD8 y FoxP3 se llevó a cabo en distintas ocasiones por un patólogo que era ciego a los datos clínicos tal como sigue: para cada paciente, se definió la infiltración de células inmunitarias mediante una puntuación de 1 (promedio, de 1 a 1,67), 2 (promedio, de 1,67 a 2,33) o 3 (promedio, > 2,33). Para análisis estadístico, una puntuación de 1 se consideró baja, y 2 y 3 se consideraron altas. (B) Una alta infiltración estromal de células T CD4⁺ se asocia con supervivencia prolongada en presencia de FoxP3. Tal como se describe en a. usando anticuerpo policlonal de cabra, R&D Systems a una dilución 1:100 para teñir células CD4⁺.

La figura 12 representa la distribución de puntuaciones de MSLN: cáncer de mama triple negativo (TNBC) frente a cáncer distinto de TNBC.

Las figuras 13A-F representan el perfil de supervivencia: MSLN⁺TNBC frente a NSLN⁻TNBC.

La figura 14 representa la medición de los niveles de péptido relacionado con MSLN soluble preoperatorios (SMRP) en los sueros de pacientes con ADC de pulmón en estadio I.

Las figuras 15A-C representan el desarrollo de modelos de ratón.

La figura 16 representa la eficacia de M28z para reducir la carga tumoral en un modelo de ratón de metástasis de pulmón.

Las figuras 17A-D representan células T M28z en la destrucción por vecindad específica de antígeno de dianas de baja expresión de MSLN en comparación con dianas de alta expresión de MSLN.

La figura 18 representa PD-L1- que expresa células MSTO-211H (mesotelioma pleural humano).

La figura 19 representa la estructura de MBBz.

Las figuras 20A-C representan que la coestimulación de CD28 y 4-1BB dirigida a MSLN mejoró la función de células T-CAR en presencia de proteínas inmunosupresoras secretadas por el tumor.

Las figuras 21A-C representan que la coestimulación de CD28 y 4-1BB dirigida a MSLN mejoró la función de células T-CAR en presencia de proteínas inmunosupresoras secretadas por el tumor.

La figura 22 representa la citotoxicidad de M28-IL12 y M28z en células cancerosas MSLN⁺.

La figura 23 representa el impacto de IL-12 en la expresión de citocinas inducidas por M28z.

Las figuras 24A-E representan los CAR según el contenido dado a conocer actualmente. (A) Se muestra la estructura de SFG-M28z. (BB se muestra la estructura de SFG-MBBz. (C) Se muestra la estructura de SFG-M28z-4-1BBL. (D) Se muestra la estructura de SFG-4-1BBL-M28z. (E) Se muestra la estructura de SFG-M28z-IRES-Flexi-IL-12 (donde IRES puede expresarse alternativamente bajo el control de un elemento de sensible a interferón o NFAT).

La figura 25 representa la estructura de SFG-M28z-EGFRt.

La figura 26 representa el mapa de restricción de SFG-iC9-M28z.

Las figuras 27 A-C representan células T humanas que expresan niveles variables de M28z.

La figura 28 representa líneas de células dianas que expresan niveles variables de mesotelina humana.

Las figuras 29A y B representan la producción de citocinas de células T M28z⁺ contra células diana que expresan niveles variables de mesotelina humana.

La figura 30 representa la citotoxicidad de células T M28z⁺ contra células diana que expresan niveles variables de mesotelina humana.

Las figuras 31A-C representan la producción de citocinas y la citotoxicidad de células T M28z⁺ contra células diana que expresan niveles variables de mesotelina humana (MSLN). (A) células MSTO-211H que expresan diferentes niveles de MSLN. (B) Análisis de CTL en células MSTO-211H que expresan diferentes niveles de MSLN. (C) producción de citocinas en células MSTO-211H que expresan diferentes niveles de MSLN.

La figura 32 representa que el tratamiento previo con cisplatino promovió la eficacia de una célula T que expresa CAR específica de MSLN dada a conocer actualmente.

La figura 33 representa que la radioterapia promovió la eficacia de una célula T que expresa CAR específico de MSLN dada a conocer actualmente. Secreción de quimiocinas y citocinas *in vitro* (A) e *in vivo* (B) 72 h tras la exposición a radioterapia hemitorácica (HTRT) en ratones con tumores torácicos.

La figura 34 representa que la radioterapia promovió la eficacia de una célula T que expresa CAR específica de MSLN dada a conocer actualmente en su totalidad. La radioterapia hemitorácica antes de la administración de células T-CAR+ aumentó la acumulación de células T tal como se monitoriza mediante BLI de células T, el análisis de bazo recogidos (día 56, células T) mostró una mayor proporción de células T persistentes, en comparación con ratones que recibían células T solas.

Las figuras 35A-E representan que la administración regional de células T transducidas con MSLN-CAR da como resultado una eficacia antitumoral superior. (A) La función efectora específica de antígeno de células T transducidas con MSLN-CAR tal como se muestra mediante lisis de células diana que expresan MSLN, pero que no expresan PSMA medidas mediante ensayos de liberación de cromo. (B y D) BLI de tumores de ratones NOD/SCID/β₂-microglobulina^{-/-} que portan tumor pleural. Los ratones que portan tumores se trataron con o bien 1×10⁵ (1×) o bien 3×10⁶ (30×) células T M28z por vía intravenosa (E:D, 1:3000 o 100, respectivamente), en comparación con 1×10⁵ (1×) o 3×10⁵ (3×) células T M28z por vía intrapleural (E:D, 1:3000 o 1000, respectivamente). La muerte se representa por un asterisco (*). (C y E) El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier demuestra una eficacia superior con administración intrapleural (línea de color azul continua), en comparación con la administración intravenosa (línea de color azul discontinua). No se alcanzó la mediana de supervivencia para la administración intrapleural de M28z; la mediana de supervivencia para la administración intravenosa fue de 27 días (1×) y 86 días (30×). Los ratones de control tratados con P28z pleural (línea de color negro) tenían una mediana de supervivencia de 27 a 42 días (n=4-10 por grupo). Se analizaron las curvas de supervivencia con prueba de rangos logarítmicos. **P < 0,01; ***P < 0,001.

Las figuras 36A-E representan que las células T M28z⁺ administradas por vía intrapleural presentan proliferación temprana y robusta de subconjuntos tanto de CD4⁺ como CD8⁺. (A) BLI de células T en serie en ratones que portan tumores. Las células T M28z⁺ administradas por vía intravenosa presentan acumulación retardada pero equivalente en el tumor pleural progresivo. (B) Intensidades de señal promedio de luciferasa effLuc a partir de BLI de células T secuencial. Las células T administradas por vía intrapleural (líneas de color azul) presentan una acumulación más temprana y sostenida, con señal de células T máxima en el día 5. Las células T administradas por vía intravenosa muestran acumulación retardada, con señal máxima en el día 7. (C) Las razones E:D reflejan la acumulación de células T M28z en paralelo con la carga tumoral a las 6 h y los días 1, 3, y 7, confirmando los hallazgos de BLI de células T. La administración intravenosa muestra acumulación de células T retardada, menores razones E:D e infiltración de células T CD8⁺ reducida. (D) El análisis mediante FACS en el día 7 presenta una acumulación igual de subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺ dentro del tumor y bazo después de la administración intrapleural, en comparación con acumulación tumoral reducida de células T CD8⁺ e igual distribución de células T CD4⁺ y CD8⁺ en el bazo después de la administración intravenosa. (E) Se observó una disminución en la expresión de CD62L en células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ tras la administración intrapleural. Las barras de error representan ± EEM. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 mediante la prueba de la t de Student.

Las figuras 37A-C representan que las células T M28z⁺ administradas por vía intrapleural presentan un tráfico y acumulación sistémicos eficientes en tumor extrapleural de una manera específica de antígeno. (A) BLI de células T y tumores en serie con obtención de imágenes de luciferasa dual, lo que demuestra tráfico sistémico y acumulación de tumor extrapleural. Los ratones con tumor ffluc+ MSLN+ establecido en el costado derecho y la cavidad pleural y tumor MSLN- en el costado izquierdo recibieron células T M28z luciferasa+ de *Gaussia* por vía intrapleural. Un ratón representativo con tumor en los costados y la cavidad pleural antes de la administración de células T (izquierda). La BLI de células T 15 días después de la administración de células T (medio) demuestra células T residuales en la cavidad pleural y acumulación en el tumor en el costado derecho MSLN+ (medio). Un día después, la BLI de

tumores muestra una carga reducida en el tumor en el costado izquierdo MSLN+, en comparación con el tumor en el costado izquierdo MSLN- (derecha). (B y C) Las células T M28z+ administradas por vía intrapleural muestran acumulación temprana y robusta en tumor intraperitoneal MSLN+, en comparación con células T administradas por vía intravenosa. (C) La cuantificación del aumento en veces de la intensidad de señal de la cavidad peritoneal en ratones que portan tumores presenta acumulación de células T mejorada con administración intrapleural, en comparación con administración intravenosa (n=3 por grupo, las barras de error representan $\pm$ EEM).

Las figuras 38A y 38B representan que las células T administradas por vía intrapleural M28z erradican el tumor pleural y establecen persistencia predominante de CD4+ a largo plazo. (A) La coestimulación de CD28 facilita la erradicación del tumor tras una única dosis de células T. En total, 1×10^5 células T-CAR+ Mz, M28z o P28z (control negativo) se administraron por vía intrapleural en ratones que portan tumores establecidos. (Izquierda) Carga tumoral. (Derecha) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier. La mediana de supervivencia de los grupos Mz y M28z (al menos 9 ratones por grupo) fue de 63 días y la mediana de supervivencia no alcanzada, respectivamente. Se analizó la curva de supervivencia mediante prueba de rangos logarítmicos. $**P < 0,01$. (B) La coestimulación de CD28 mejora la persistencia de células T-CAR+. Recuentos absolutos de células T-CAR+ (por ml de sangre periférica) a los 50 días después de la administración intrapleural de 3×10^6 células T-CAR+. Las barras de error representan $\pm$ EEM, $*P < 0,05$ mediante la prueba de la t de Student.

La figura 39 representa BLI de tumores de ratones reexpuestos con tumor MSLN+ y MSLN-. Ochenta y siete días después de la erradicación del tumor pleural, tras la administración de una única dosis de 3×10^5 células T M28z o Mz, se inyectaron 1×10^6 MSLN+ o MSLN- células tumorales en la cavidad peritoneal. Tras la reexposición al tumor, las células T Mz impiden el crecimiento tumoral, mientras que las células T M28z promueven la regresión tumoral.

Las figuras 40A-F representan que las células T CD4+ M28z aumentan la acumulación de CD8+ que está mejorada con la preactivación. (A-C) Se sometieron a ensayo células T CD4+ y CD8+ clasificadas con perlas o M28z y Mz no clasificadas. Las células T M28z CD4+ muestran una (A) mayor secreción de citocinas (desde 4 hasta 14 veces; $***P < 0,001$ mediante la prueba de la t de Student) y (B) expansión profunda de células T sin IL-2 exógena. (C) La activación de CD4+ M28z facilita una acumulación robusta de células T CD8+ M28z tras la estimulación de antígeno repetida *in vitro*. (D) La activación de CD4+ M28z activada por antígeno facilita la acumulación robusta de células T CD8+ M28z *in vivo*. Se administraron por vía intrapleural células T CD8+ effLuc M28z aisladas a ratones que portan tumores pleurales MSLN+ con o bien células T CD4+ M28z (n=6) o bien CD4+ transducidas con control T (n=6) y se obtuvieron imágenes en serie. Un ratón representativo (n=6 por grupo; izquierda) presenta acumulación aumentada de células T CD8+ M28z en presencia de CD4+ M28z. (E) La acumulación promedio de células T-CAR+ CD8+ se calculó en los intervalos indicados (los valores de P tal como se muestran que calculan un aumento en veces de desde 16 hasta 72 horas, n=6 por grupo). (F) La preactivación de M28z CD4+ mejora la proliferación de CD8+, en comparación con la activación simultánea de CD4+. Se cultivaron conjuntamente células T CD8+ Mz o M28z clasificadas con perlas con o bien células T CD4+ Mz o M28z correspondientes o células T CD4+ preactivadas (activadas en células tumorales MSLN+ 24 h antes del ensayo). La preactivación de M28z CD4+ mejora la acumulación de CD8+ en mayor medida que la estimulación simultánea de CD8+ y CD4+.

Las figuras 41A-E representan que las células T-CAR+ CD4+ MSLN demuestran una función citolítica eficaz que es dependiente de granzima/perforina. (A) Las células T CD4+ M28z muestran una citotoxicidad retardada pero similar que las células T CD8+ M28z. (B) La coestimulación de CD28 mejora la citotoxicidad mediada por CD4+. (C) Los sobrenadantes ricos en citocina obtenidos a partir de células T-CAR+ CD4+ M28z estimuladas mejoran la citotoxicidad de células T tanto CD8M28z como CD4M28z. (D) La función lítica de células T-CAR depende de la liberación de gránulos citotóxicos. Se cultivaron conjuntamente células T globales, CD4 o CD8 M28z y Mz durante 18 h en presencia o ausencia del agente quelante ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA). (A-D) Citotoxicidad de células T CD4+ o CD8+ Mz y M28z purificadas con perlas. (E, izquierda) Las células T-CAR CD4+ expresan granzima B, pero con cinética retardada, en comparación con células T-CAR CD8+. Se realizó análisis mediante FACS intracelular para granzimas B en PBMC en reposo, blastocitos estimulados con PHA y células T M28z, Mz y P28z estimuladas con MSLN+ durante 4 ó 18 h. (E, derecha) La coestimulación de CD28 mejora la expresión de granzima B. Los histogramas muestran expresión a las 18 h después de la estimulación de MSLN+. Las barras de error representan $\pm$ EEM, $*P < 0,05$ mediante la prueba de la t de Student.

Las figuras 42A-C representan que las células T-CAR CD4+ M28z administradas por vía intrapleural son eficaces cuando se administran solas *in vivo*; median eficacia mejorada, en comparación con células T CD8+ M28z; y establecen persistencia funcional a largo plazo. (A) BLI de seguimiento de la progresión de la carga tumoral. Dieciocho días después de la inyección del tumor, los ratones recibieron o bien 3×10^5 (3x), 1×10^5 (1x) o bien 3×10^4 (0,3x) células T-CAR+ de M28z global (n=5), CD4+, CD8+ M28z clasificados con perlas (n=7) o P28z (n=4). (B) Curva de supervivencia de Kaplan-Meiers. A todas las dosis, las células T-CAR+ CD4+ M28z fueron eficaces, en comparación con células T-CAR+ CD8+. La eficacia antitumoral de células T-CAR+ CD4+ fue comparable con la de células T-CAR+ no clasificadas. $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$ mediante la prueba de la t de Student. Se proporcionan datos sin procesar y valores de P en los Materiales complementarios. (C) BLI de tumores de ratones reexpuestos con tumor. A los 196 días después de la administración intrapleural de una única dosis de 3×10^5 (3x) células T M28z no clasificadas (globales) o M28z clasificadas con CD4+, se inyectaron 1×10^6 células tumorales MSLN+ en la cavidad peritoneal. Las células T CD4+ M28z persistentes evitaron el crecimiento tumoral.

Las figuras 43A y 43B representan que las células T-CAR dirigidas a mesotelina demuestran función efectora específica de antígeno. (B) El análisis mediante FACS de líneas de células tumorales usadas para el análisis *in vitro* de la función efectora de células T-CAR. (C) Las células T-CAR M28z secretaron una cantidad de 2 a 5 veces mayor de las citocinas Th1.

- 5 La figura 44 representa análisis mediante FACS intracelular para granzimas A y B, que se realizó en PBMC en reposo, blastocitos estimulados con PHA y células T-CAR M28z estimuladas con MSLN+, mostradas en este caso tras un cultivo conjunto de 18 h.

Las figuras 45A y 45B representan que la función citolítica de células T-CAR es proporcional al nivel de expresión de antígeno diana. (A) Expresión de mesotelina superficial por células tumorales de mesotelioma MSTO-211H transducidas con un nivel de mesotelina o bien bajo (gris) o bien alto (negro). La tinción de isotipo se incluye como referencia. (B) Función citolítica de células T-CAR M28z medida mediante la liberación de cromo tras un cultivo conjunto de 18 h de células T y dianas o bien bajas o bien altas de mesotelina a las razones indicadas de efector con respecto a diana.

- 15 Las figuras 46A y 46B representan la estrategia de selección para citometría de flujo. (A) Para análisis *in vitro* e *in vivo* usando células T-CAR CD4 y CD8 clasificadas, se clasificaron todas las muestras para que tuvieran >95% de pureza. (B) Se realizó análisis de fenotipo de células T con controles no transducidos apropiados (para determinar puerta positiva para CAR) y con controles de isotipo para establecer las puertas para CD62L y CD45RA.

Las figuras 47A-E representan receptores de antígeno quimérico (CAR) con coestimulación de CD29 o 4-1BB presentan secreción y proliferación de citocinas efectoras equivalentes *in vitro* tras la estimulación de antígeno inicial. (A) CAR de primera y segunda generación. (B) Los CAR dirigidos a mesotelina (MSLN) contienen el endodominio CD3 ζ o bien solo (Mz, CAR de primera generación) o bien en combinación con el dominio coestimulador de CD28 (M28z) o 4-1BB (MBBz) (CAR de segunda generación). Un CAR dirigido a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) con coestimulación de CD28 (P28z) así como dianas que expresan PSMA (PSMA+) se incluyen en experimentos como controles negativos. CYT, dominio citoplasmático; LS, secuencia líder; LTR, repetición terminal larga; SA, aceptor de corte y empalme; SD, donador de corte y empalme; TM, transmembrana. (C-E) Funciones efectoras específicas de antígeno de células T transducidas con CAR. (C) Lisis de dianas que expresan MSLN (MSLN+), pero no dianas PSMA+, tal como se mide mediante ensayos de liberación de cromo. (D) Las coestimulaciones de 4-1BB y CD28 mejoran la secreción de citocinas, tal como se evalúa mediante ensayo Luminex, después del cultivo conjunto de células T-CAR con células MSLN+. (E) Los CAR M28z y MBBz facilitan la acumulación robusta de células T después de la estimulación con células MSLN+. Los datos representan la media $\pm$ EEM (C, E) de tres réplicas o se representan gráficamente como puntos individuales (D). *** $P < 0,001$, que compara células T-CAR coestimuladas (M28z o MBBz) con el receptor de primera generación (Mz), mediante la prueba de la *t* de Student; se determinó la significación usando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones.

- 35 Las figuras 48A-C representan que los ratones tratados con células T-CAR M28z y MBBz demuestran erradicación del tumor a una dosis mayor mientras que el tratamiento con dosis menores da como resultado una mayor tasa de recidiva tumoral con M28z. (A) Se usó obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) *in vivo* para monitorizar la carga tumoral (luciferasa de luciérnaga+ MSLN+) en ratones NOD/SCID/ γ_c^{null} . Los ratones con tumor pleural establecido se trataron con una única dosis de $1e5$ (E:D 1:3.000), $8e4$ (E:D 1:3.750) o $5e4$ (E:D 1:6.000) células T-CAR M28z o MBBz. El símbolo (†) indica la muerte de un ratón. Se combinan dos experimentos similares con el mismo donador para la ilustración. (B) Los ratones se trataron con $4e4$ células T-CAR (E:D 1:7.500). Se incluyen el CAR Mz de 1ª generación y control negativo P28z. (C) Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier que compara la eficacia de administración intrapleural *in vivo* de $4e4$ células T-CAR Mz (n=13, color rojo), M28z (n=15, color azul), MBBz (n=8, color verde) y P28z (n=3, color negro). Mediana de supervivencia en días tras la administración de células T. Se analizó la curva de supervivencia usando la prueba de rangos logarítmicos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Las figuras 49A-C representan que los ratones tratados con M28z y MBBz demuestran una acumulación de células T-CAR temprana y a largo plazo similar, y ratones tratados con M28z con tumores progresivos contienen células T-CAR persistentes. (A) La coestimulación de CD28 y 4-1BB mejora la acumulación de células T-CAR intratumoral en partes iguales. Los paneles de la izquierda muestran los resultados de BLI de tumores después de la administración de una única dosis $8e4$ de células T-CAR. Después de 6 días, se recogieron células T del tumor; x denota ratones cuyos recuentos de células T se representan como puntos de tiempo. El panel de la derecha muestra células T-CAR absolutas por gramo de tejido tumoral (* $P < 0,05$). Se realizaron pruebas de la *t* de Student y se determinó la significación estadística usando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. (B) La coestimulación de CD28 y 4-1BB mejora la persistencia de células T-CAR, tal como se mide en el bazo, en partes iguales. Se muestran células T-CAR absolutas por bazo 73 días después de la administración intrapleural de células T-CAR ($8e4$). Los paneles de la izquierda muestran los resultados de BLI de tumores; x denota ratones cuyos recuentos de células T se representan como puntos de tiempo (* $P < 0,05$). Se realizaron pruebas de la *t* de Student y se determinó la significación estadística usando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. (C) Los ratones tratados con una dosis baja de células T M28z ($4e4$) presentan recaída tumoral con células T-CAR persistentes en el bazo y tumor. El panel de la izquierda muestra los resultados de BLI de tumores. Se recogieron el bazo y el tumor de ratones denotados por una x y se usaron para análisis mediante FACS (panel central) y

cuantificación de células T (panel de la derecha).

Las figuras 50A-D representan que las células T-CAR se agotan tras la exposición a antígeno *in vivo*, aunque las células T-CAR MBBz conservan preferentemente la secreción de citocinas efectoras y citotoxicidad. (A) Seis días después de la administración intrapleural de células T-CAR, se aislaron células T-CAR M28z y MBBz del tumor y bazo y se sometieron a estimulación de antígeno *ex vivo*. (B) Ensayo de liberación de cromo tras la estimulación *ex vivo* demuestra una disminución en M28z pero función citolítica MBBz persistente (razón E:D 1:5) (C) Las mediciones de la secreción de citocinas demuestran disminuciones en la secreción de citocinas efectoras por células T-CAR, aunque las células T-CAR MBBz pueden conservar mejor la secreción. (D) Las mediciones de RT-PCR de la expresión de GzB, IFN- γ e IL-2 por células T-CAR recogidas se correlacionan bien con las mediciones del nivel de proteínas en los paneles (A) y (B). Los datos representan el cambio en veces en relación con la expresión de ARNm de célula T-CAR M28z no estimulada *in vitro*. Los datos representan la media $\pm$ EEM de tres pocillos individuales por condición. Se realizaron pruebas de la t de Student, y se determinó la significación estadística usando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Los resultados se reproducen en dos cohortes diferentes de ratones usados para cada uno de los dos experimentos.

Las figuras 51A-E representan que las células T-CAR se agotan tras la estimulación de antígeno repetida *in vitro*, aunque las células T-CAR MBBz conservan preferentemente la secreción de citocinas efectoras y citotoxicidad *in vitro* y tras la reexposición tumoral *in vivo*. (A) Tanto las células T-CAR M28z con MBBz conservan capacidad proliferativa *in vitro* tras la estimulación de antígeno repetida. También se sometieron a prueba las células T para determinar la citotoxicidad mediante ensayo de liberación de cromo y para determinar la secreción de citocinas mediante ensayo Luminex (B-D). (B) (Izquierda) Las células T-CAR demuestran una destrucción igual en la primera estimulación y pérdida de función citolítica tras la estimulación de antígeno repetida, aunque las células T-CAR MBBz pueden conservar mejor la función citolítica tal como se mide mediante ensayo de liberación de cromo. (C) La liberación de gránulos citotóxicos tal como se mide mediante la expresión de CD107a (se muestra en la tercera estimulación) se correlaciona con el ensayo de liberación de cromo (B). Los datos representan la media $\pm$ DE (triplicados) del cambio en veces en relación con la IFM de CD107a de células T-CAR no estimuladas. (D) Las mediciones de secreción de citocinas demuestran de manera similar pérdida de función efectora de células T-CAR tras el encuentro repetido con el antígeno; de nuevo, las células T-CAR MBBz pueden conservar mejor su función. (E) Aunque igualmente persistentes, las células T-CAR MBBz demuestran una persistencia funcional superior. Veintiocho días después de la erradicación del tumor pleural (tras una única dosis de $1e^5$ células T-CAR), se inyectaron $1e^6$ células tumorales MSLN+ en la cavidad pleural (reexposición tumoral). Las células T-CAR MBBz evitaban el crecimiento tumoral en todos los ratones, mientras que se observaron crecimiento y muerte tumoral en 2 de 4 ratones inicialmente tratados con células T-CAR M28z. se realizaron pruebas de la t de Student y se determinó la significación estadística usando la corrección de Bonferroni (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). Los datos representan la media $\pm$ EEM de tres réplicas o se representan gráficamente como puntos individuales.

Las figuras 52A-F representan que el receptor PD-1 y sus ligandos se regulan por incremento *in vivo*. (A) Las células T-CAR M28z y MBBz que infiltran el tumor expresan receptores inhibidores 6 días después de su administración, pero las células T-CAR MBBz expresan niveles mejores de PD-1. (B) La intensidad de fluorescencia media (FM, *mean fluorescence intensity*) de la expresión del receptor PD-1 de células T-CAR que infiltran el tumor (TIL) 6 días después de la administración intrapleural. (C) Expresión relativa de ARNm de PD-1 en subconjuntos de células T-CAR CD4 y CD8 que infiltran el tumor 6 días después de la administración intrapleural. Los datos se representan en cambios en veces en relación con el ARNm de expresión de PD-1 de células T M28z no estimuladas. (D) Las células T-CAR que infiltran el tumor M28z aisladas de tumores progresivos expresan los receptores inhibidores PD-1, Tim-3 y Lag-3. (E) Las suspensiones de tumor de células individuales recogidas de ratones tratados con células T-CAR M28z expresan altos niveles de ligandos de unión a PD-1. (F) Las células tumorales de mesotelioma cultivadas *in vitro* expresan los ligandos (PD-L1, PD-L2) para el receptor PD-1, y la expresión se regula por incremento adicionalmente tras incubación durante 24 h con IFN- γ y TNF- α .

Las figuras 53A-D representan que PD-L1 inhibe la función efectora de células T-CAR. (A) Los fibroblastos 3T3 se transdujeron para expresar o bien mesotelina sola (MSLN+, izquierda) o bien coexpresar MSLN además de PD-L1 (MSLN+ PD-L1+, derecha). (B-D) Se evaluaron las funciones efectoras de células T-CAR M28z y MBBz después de la estimulación con dianas 3T3 MSLN+ o MSLN+ PD-L1+. PD-L1 inhibe la acumulación de células T-CAR M28z y MBBz tras la estimulación de antígeno repetida (B), función citolítica tras dos estimulaciones con células tumorales MSLN+ PD-L1+ (C), y secreción de citocinas efectoras Th1 tras la primera estimulación (D). Los datos representan la media $\pm$ EEM de tres réplicas o se representan gráficamente como puntos individuales.

La figura 54 representa la transducción retroviral eficaz de células T humanas para expresar CAR Mz, M28z y MBBz. (Parte superior) Se muestra análisis mediante FACS representativo 4 días después de la transferencia génica. Se usó fluorescencia menos una tinción para establecer puertas positivas después de que una tinción de células vivas/muertas excluyera células no viables. Todos los experimentos usaron células T con del 50% al 70% de eficiencia de transducción de CAR; los porcentajes de transducción entre grupos de células T dentro del 5% entre sí. (Parte inferior) Ambos subconjuntos de células T CD4+ y CD8+ se transdujeron de manera eficaz. Se muestran los porcentajes de CD4+ y CD8+ después de seleccionar células T-CAR.

La figura 55 representa que las células T-CAR MBBz expresan un fenotipo menos agotado, más potente en

comparación con células T-CAR M28z. Se expandieron células T coestimuladas con 4-1BB y CD28 con estimulación de antígeno repetida, y se extrajo ARNm y se sometió a análisis de RT-PCR 20 h después de la tercera estimulación. Los datos se representan en cambios en veces en relación con la expresión de ARNm de células T CD4+ no transducidas. Las células T-CAR MBBz expresan mayores niveles de *EOMES* (eomesodermina) y *TBX21* (T-bet), y niveles menores de *PDCD1* (PD-1) y *FOXP3* (Foxp3). Todas las comparaciones fueron significativas a $P < 0,001$. Los resultados fueron similares en 3 experimentos diferentes usando diferentes donadores.

La figura 56 representa que las células T-CAR M28z y MBBz coexpresan PD-1 junto con otros receptores inhibidores. Las células T-CAR M28z y MBBz que infiltran el tumor se recogieron 6 días tras la administración intrapleural a ratones que portan tumores pleurales. Las células se tiñeron conjuntamente con anticuerpos para PD-1 y o bien Lag-3 (izquierda) o bien Tim-3 (derecha) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se usaron controles de tinción de isotipo (parte superior) para establecer puertas positivas.

La figura 57 representa la expresión de MSLN en diversas células cancerosas y normales.

La figura 58 representa la cuantificación de moléculas de MSLN por célula en diversas células cancerosas y normales.

La figura 59 representa el nivel de expresión de MSLN de ARNm en diversas células cancerosas y normales.

La figura 60 representa la citotoxicidad de células T-CAR M28z en diversas células cancerosas y normales.

La figura 61 representa la acumulación de células T-CAR después de la estimulación repetida de antígeno en presencia de IL-2 exógena.

La figura 62 representa la acumulación de células T-CAR después de la estimulación repetida de antígeno en ausencia de IL-2 exógena.

Las figuras 63A-C representan la eficacia *in vivo* de células T-CAR M28z en un modelo de cáncer de pulmón. (A) Diseño del estudio. (B) Análisis de crecimiento tumoral mediante bioluminiscencia (BLI). (C) Análisis de supervivencia.

Las figuras 64A-D representan la acumulación *in vivo* de células T-CAR M28z en un modelo de cáncer de pulmón. (A) Diseño del estudio. (B-D) Análisis de acumulación de células T mediante BLI.

Descripción detallada de la invención

El contenido dado a conocer actualmente proporciona en general receptores de antígeno quimérico dirigidos a mesotelina (CAR). En un ejemplo no limitativo, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, donde el dominio de unión a antígeno extracelular se une específicamente a mesotelina humana con una afinidad de unión (K_d) de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM. El contenido dado a conocer actualmente también proporciona células inmunorreactivas (por ejemplo, célula T, un linfocito citolítico natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL), una célula T reguladora, una célula madre embrionaria humana y una célula madre pluripotente de la cual pueden diferenciarse células linfoides) que expresan los CAR dirigidos a mesotelina, y métodos de uso de tales células inmunorreactivas para tratar neoplasia y otras patologías. Las células malignas han desarrollado una serie de mecanismos para protegerse del reconocimiento y eliminación inmunitarios. El presente enfoque proporciona inmunogenicidad dentro del microentorno tumoral para la erradicación del tumor, y representa un avance significativo con respecto a la terapia de células T adoptiva convencional.

I. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walquer ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” o “sobre” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular tal como determina un experto habitual en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 3 o más de 3 desviaciones estándar, según la práctica en la técnica. De manera alternativa, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferiblemente hasta el 10%, más preferiblemente hasta el 5%, y más preferiblemente todavía hasta el 1% de un valor dado. De manera alternativa, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un

orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor.

Tal como se usa en el presente documento, el término "población celular" se refiere a un grupo de al menos dos células que expresan fenotipos similares o diferentes. En ejemplos no limitativos, una población celular puede incluir al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000 células que expresan fenotipos similares o diferentes.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa no sólo moléculas de anticuerpo intactas, sino también fragmentos de moléculas de anticuerpo que conservan la capacidad de unión a inmunógeno. Tales fragmentos también se conocen en la técnica y se emplean regularmente tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa no sólo moléculas de inmunoglobulina intactas sino también fragmentos activos bien conocidos $F(ab')_2$ y Fab. Los fragmentos $F(ab')_2$ y Fab que carecen del fragmento F_c de anticuerpo intacto, se someten a aclaramiento más rápidamente de la circulación, y pueden tener una unión tisular menos específica de un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983). Los anticuerpos de la invención comprenden anticuerpos nativos completos, anticuerpos biespecíficos; anticuerpos quiméricos; Fab, Fab' , fragmentos de la región V de cadena sencilla (scFv), polipéptidos de fusión y anticuerpos no convencionales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento variable de cadena sencilla" o "scFv" es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de una inmunoglobulina (por ejemplo, de ratón o humana) ligadas de manera covalente para formar un heterodímero $V_H::V_L$. Las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) se unen o bien directamente o bien se unen por un ligador que codifica para el péptido (por ejemplo, 10, 15, 20, 25 aminoácidos), que conecta el extremo N-terminal de la V_H con el extremo C-terminal de la V_L , o el extremo C-terminal de la V_H con el extremo N-terminal de la V_L . El ligador es habitualmente rico en glicina para la flexibilidad, así como serina o treonina para la solubilidad. El ligador puede ligar la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del dominio de unión a antígeno extracelular. En un ejemplo no limitativo, el ligador comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:17 tal como se proporciona a continuación.

GGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO:17]

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 se expone en SEQ ID NO: 18, que se proporciona a continuación:

GGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCA [SEQ ID NO:18].

En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos f SEQ ID NO:17 se expone en SEQ ID NO: 19, que se proporciona a continuación.

GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCA [SEQ ID NO:19]

A pesar de la retirada de las regiones constantes y la introducción de un ligador, las proteínas de scFv conservan la especificidad de la inmunoglobulina original. Los anticuerpos del polipéptido Fv de cadena sencilla pueden expresarse a partir de un ácido nucleico que comprende las secuencias que codifican para V_H y V_L tal como describen Huston, *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988). Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778; y la publicación de patente estadounidense n.ºs 20050196754 y 20050196754. Se han descrito scFv antagonistas que tienen actividad inhibidora (véase, por ejemplo, Zhao *et al.*, Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter *et al.*, J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh *et al.*, J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli *et al.*, Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife *et al.*, J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks *et al.*, Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer *et al.*, Ther Immunol 1995 2(10:31-40). Se han descrito scFv agonistas que tienen actividad estimuladora (véase, por ejemplo, Peter *et al.*, J Bioi Chem 2003 25278(38):36740-7; Xie *et al.*, Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter *et al.*, Crit Rev Immuno 1997 17(5-6):427-55; Ho *et al.*, Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66).

Tal como se usa en el presente documento, "F(ab)" se refiere a un fragmento de una estructura de anticuerpo que se une a un antígeno pero es monovalente y no tiene una porción de F_c , por ejemplo, un anticuerpo digerido por la enzima papaína produce dos fragmentos F(ab) y un fragmento F_c (por ejemplo, una región constante de cadena pesada (H); la región de F_c que no se une a un antígeno).

Tal como se usa en el presente documento, " $F(ab')_2$ " se refiere a un fragmento de anticuerpo generado mediante digestión con pepsina de anticuerpos IgG completos, en el que este fragmento tiene dos regiones (bivalentes) de unión a antígeno (ab'), en el que cada región de (ab') comprende dos cadenas de aminoácidos distintas, una parte de una cadena H y una cadena ligera (L) ligada por un enlace S-S para la unión a un antígeno y en el que las porciones de cadena H restantes se ligan entre sí. Un fragmento " $F(ab')_2$ " puede dividirse en dos fragmentos Fab' individuales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que puede realizar replicación cuando se asocia con los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias de genes en las células. Por tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales y vectores plasmídicos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “vector de expresión” se refiere a una secuencia recombinante de ácido nucleico, es decir molécula de ADN recombinante, que contiene una secuencia codificante deseada y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante ligada de manera operativa en un organismo huésped particular. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para expresión en procariotas habitualmente incluyen un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión a ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, agentes de mejora y señales de terminación y poliadenilación.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “afinidad” quiere decir una medida de la fuerza de unión. Sin limitarse a la teoría, la afinidad depende de la cercanía del ajuste estereoquímico entre los sitios de combinación de anticuerpos y los determinantes del antígeno, del tamaño del área de contacto entre ellos y de la distribución de los grupos cargados e hidrófobos. La afinidad también incluye el término “avidez”, que se refiere a la fuerza del enlace antígeno-anticuerpo después de la formación de complejos reversibles. Los métodos para calcular la afinidad de un anticuerpo por un antígeno se conocen en la técnica, comprendiendo el uso de experimentos de unión para calcular la afinidad. La actividad de anticuerpos en ensayos funcionales (por ejemplo, ensayo de citometría de flujo) también refleja la afinidad del anticuerpo. Los anticuerpos y las afinidades pueden caracterizarse fenotípicamente y compararse usando ensayos funcionales (por ejemplo, ensayo de citometría de flujo).

20 Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. Tales moléculas de ácido nucleico no necesitan ser el 100% idénticas a una secuencia de ácido nucleico endógeno, pero normalmente presentarán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen “identidad sustancial” con una secuencia endógena pueden normalmente hibridarse con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Por “hibridar” quiere decirse un par para formar una molécula bicatenaria entre secuencias polinucleotídicas complementarias (por ejemplo, un gen descrito en el presente documento), o porciones de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

30 Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa será comúnmente de menos de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato de trisodio 75 mM, preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato de trisodio 500 mM, y más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato de trisodio 25 mM. Puede obtenerse hibridación de baja rigurosidad en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse hibridación de alta rigurosidad en presencia de al menos aproximadamente formamida al 35%, y más preferiblemente al menos aproximadamente formamida al 50%. Las condiciones de temperatura rigurosa incluirán comúnmente temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37°C, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C. Los expertos en la técnica conocen bien parámetros adicionales variables, tales como tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN portador. Se logran diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización preferida, la hibridación se producirá a 30°C en NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM y SDS al 1%. En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 37°C en NaCl 500 mM, citrato de trisodio 50 mM, SDS al 1%, formamida al 35% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 μ g/ml (ADNmc). En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 42°C en NaCl 250 mM, citrato de trisodio 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50% y ADNmc 200 μ g/ml. Las variaciones útiles de estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

45 Para la mayoría de aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en rigurosidad. Las condiciones rigurosas de lavado pueden definirse por la concentración de sal y por la temperatura. Tal como antes, la rigurosidad del lavado puede aumentarse disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente de menos de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato de trisodio 3 mM, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato de trisodio 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán comúnmente una temperatura de al menos aproximadamente 25°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C, e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68°C. En una realización preferida, las etapas de lavado se producirán a 25°C en NaCl 30 mM, citrato de trisodio 3 mM y SDS al 0,1%. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 42°C. en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1%. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 68°C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1%. Variaciones adicionales de estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Las técnicas de hibridación las conocen bien los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein y Rogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975); Ausubel *et al.* (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

- Por "sustancialmente idéntico" quiere decirse una molécula de ácido nucleico o polipéptido que presenta al menos una identidad del 50% con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento) o secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento). Preferiblemente, una secuencia de este tipo es al menos el 60%, más preferiblemente el 80% o el 85%, y más preferiblemente el 90%, el 95% o incluso el 99% idéntica al nivel de aminoácido o ácido nucleico con respecto a la secuencia usada para comparación.
- La identidad de secuencia se mide normalmente usando un software de análisis de secuencia (por ejemplo, Paquete de software de análisis de secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Tal software concuerda secuencias idénticas o similares mediante la asignación de grados de homología a varias sustituciones, delecciones y/u otras modificaciones. En un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre e-3 y e-100 que indica una secuencia estrechamente relacionada.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "análogo" se refiere a una molécula de ácido nucleico o polipéptido relacionada estructuralmente que tiene la función de una molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a una molécula que se une a un receptor. En particular, el ligando se une a un receptor en otra célula, permitiendo reconocimiento y/o interacción entre células.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado o trastorno que daña o interfiere con la función normal de una célula, tejido u órgano. Los ejemplos de enfermedades incluyen neoplasia o infección por patógenos de una célula.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para tener un efecto terapéutico. En una realización, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para detener, mejorar o inhibir la proliferación, crecimiento o metástasis continuada (por ejemplo, invasión o migración) de una neoplasia.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "endógeno" se refiere a una molécula de ácido nucleico o polipéptido que se expresa normalmente en una célula o tejido.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a una molécula de ácido nucleico o polipéptido que no está presente de manera endógena en la célula, o no está presente en un nivel suficiente para lograr los efectos funcionales obtenidos cuando se sobreexpresa. El término "exógeno" abarcaría, por tanto, cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido recombinante que se expresa en una célula, tal como polipéptidos y moléculas de ácido nucleico foráneos, heterólogos y sobreexpresados.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico heteróloga o polipéptido" se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADNc, ADN o ARN) o polipéptido que no está presente normalmente en una célula o muestra obtenida de una célula. Este ácido nucleico puede ser de otro organismo, o puede ser, por ejemplo, una molécula de ARNm que no se expresa normalmente en una célula o muestra.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "célula inmunorreactiva" se refiere a una célula que actúa en una respuesta inmunitaria o un progenitor, o progenie del mismo.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "modular" se refiere a alterar positiva o negativamente. Las modulaciones a modo de ejemplo incluyen un cambio aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 75% o aproximadamente el 100%.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "aumentar" se refiere a alterar positivamente en al menos aproximadamente el 5%, incluyendo, pero sin limitarse a, alterar positivamente en aproximadamente el 5%, en aproximadamente el 10%, en aproximadamente el 25%, en aproximadamente el 30%, en aproximadamente el 50%, en aproximadamente el 75% o en aproximadamente el 100%.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "reducir" se refiere a alterar negativamente en al menos aproximadamente el 5% incluyendo, pero sin limitarse a, alterar negativamente en aproximadamente el 5%, en aproximadamente el 10%, en aproximadamente el 25%, en aproximadamente el 30%, en aproximadamente el 50%, en aproximadamente el 75% o en aproximadamente el 100%.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "célula aislada" se refiere a una célula que se separa de los componentes moleculares y/o celulares que acompañan de manera natural a la célula.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refiere a material que está libre en grados variables de componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. “Aislar” denota un grado de separación de la fuente original o sus alrededores. “Purificar” denota un grado de separación que es mayor que el aislamiento. Una proteína “purificada” o “biológicamente pura” está suficientemente libre de otros materiales de manera que las impurezas no afectan prácticamente a las propiedades biológicas de la proteína ni provocan otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o péptido de esta invención se purifica si está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alto rendimiento. El término “purificado” puede denotar que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Para una proteína que puede someterse a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glucosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que pueden purificarse por separado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “patógeno” se refiere a un virus, bacteria, hongo, parásito o protozoo que puede provocar una enfermedad.

Los ejemplos de virus a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HDTV-III, LAVE o HTLV-III/LAV o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que provocan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincicial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de las fiebres hemorrágicas); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del poliovirus); *Adenoviridae* (la mayoría de adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela-zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; *Poxviridae* (virus de la viruela, virus de la vaccinia, poxvirus); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis distinta de la hepatitis A, distinta de la hepatitis B (clase 1 =transmitida internamente; clase 2 =transmitida por vía parenteral (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Las bacterias a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, especies de *Pasteurella*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen pero no se limitan a, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo de grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo de grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “receptor” se refiere a un polipéptido, o porción del mismo, presente en una membrana celular que se une selectivamente a uno o más ligando.

Tal como se usa en el presente documento, el término “reconocer” quiere decir que se une selectivamente a una diana. Una célula T que reconoce un virus expresa normalmente un receptor que se une a un antígeno expresado por el virus.

Tal como se usa en el presente documento, el término “referencia” o “control” quiere decir un patrón de comparación. Por ejemplo, el nivel de unión a antígeno scFv por una célula que expresa un CAR y un scFv puede ser en comparación con el nivel de unión a antígeno scFv en una célula correspondiente que expresa CAR solo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “secretado” quiere decir un polipéptido que se libera de una célula por medio de la ruta secretora a través del retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y como una vesícula que se fusiona de manera transitoria en la membrana plasmática de la célula, liberando las proteínas fuera de la célula.

Tal como se usa en el presente documento, el término “se une específicamente” o “se une específicamente a” o “se

dirige específicamente" quiere decir un polipéptido o fragmento del mismo que reconoce y se une a una molécula biológica de interés (por ejemplo, un polipéptido), pero que no reconoce sustancialmente y se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye naturalmente un polipéptido de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el transcurso de la enfermedad del individuo o la célula que se está tratando, y puede realizarse o bien para la profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos terapéuticos del tratamiento incluyen, sin limitación, la prevención de la aparición o la recaída de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado patológico y remisión o mejor pronóstico. Al prevenir la progresión de una enfermedad o trastorno, un tratamiento puede prevenir el deterioro debido a un trastorno en un sujeto afectado o diagnosticado o un sujeto que se sospecha que tiene el trastorno, pero también un tratamiento puede prevenir la aparición del trastorno o un síntoma del trastorno en un sujeto en riesgo de padecer el trastorno o que se sospecha que tiene el trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares (por ejemplo, que va a ser el receptor de un tratamiento particular, o del cual se recogen células).

II. Receptor de antígeno quimérico (CAR).

Los receptores de antígeno quimérico (CAR) son receptores modificados por ingeniería, que injertan o confieren una especificidad de interés en una célula efectora inmunitaria. Pueden usarse CAR para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula T; con transferencia de su secuencia codificante facilitada por vectores retrovirales.

Existen tres generaciones de CAR. Los CAR de "primera generación" se componen normalmente de un dominio de unión a antígeno extracelular (por ejemplo, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv)) fusionado a un dominio transmembrana, fusionado a un dominio citoplasmático/intracelular de la cadena receptora de células T. Los CAR de "primera generación" tienen normalmente el dominio intracelular de la cadena CD3 ζ , que es el transmisor primario de señales de TCR endógenos. Los CAR de "primera generación" pueden proporcionar reconocimiento de antígenos *de novo* y producir la activación tanto de células T CD4⁺ como CD8⁺ a través de su dominio de señalización de cadena CD3 ζ en una única molécula de fusión, independiente de la presentación de antígeno mediada por HLA. Los CAR de "segunda generación" añaden dominios intracelulares de diversas moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40) a la cola citoplasmática del CAR para proporcionar señales adicionales a la célula T. Los CAR de "segunda generación" comprenden aquellos que proporcionan tanto coestimulación (por ejemplo, CD28 ó 4-1BB) como activación (CD3 ζ). Los estudios preclínicos han indicado que los CAR de "segunda generación" pueden mejorar la actividad antitumoral de células T. Por ejemplo, la eficacia robusta de células T modificadas con CAR de "segunda generación" se demostró en ensayos clínicos que seleccionan como diana la molécula CD19 en pacientes con leucemia linfoblástica crónica (LLC) y leucemia linfoblástica aguda (LLA). Los CAR de "tercera generación" comprenden aquellos que proporcionan coestimulación múltiple (por ejemplo, CD28 y 4-1BB) y activación (CD3 ζ).

Según el contenido dado a conocer actualmente, los CAR comprenden un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en los que el dominio de unión a antígeno extracelular se une a la mesotelina humana con una constante de disociación (K_d) de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM. En una realización no limitativa específica, el dominio de unión a antígeno extracelular es un scFv. En una realización no limitativa específica, el dominio de unión a antígeno extracelular es un Fab, que se reticula opcionalmente. En una realización no limitativa específica, el dominio de unión extracelular es un F(ab)₂. En una realización no limitativa específica, cualquiera de las moléculas anteriores puede estar comprendida en una proteína de fusión con una secuencia heteróloga para formar el dominio de unión a antígeno extracelular.

La mesotelina (MSLN) es un antígeno de la superficie celular inmunogénico^{27,28} que se expresa altamente en cánceres sólidos²⁸⁻³³. La MSLN está implicada en la proliferación celular³⁴, adhesión^{35,36}, invasión³⁷⁻³⁹, señalización celular³⁵ y metástasis⁴⁰. Los estudios han demostrado que el péptido soluble relacionado con MSLN sérico (SMRP) secretado por tumores que expresan MSLN puede medirse tanto en seres humanos^{32,33,41-47} como en ratones, y se ha demostrado que se correlaciona con la terapia respuesta y el pronóstico. En tejidos normales, la MSLN se expresa sólo en la pleura, pericardio y peritoneo, a niveles bajos^{28,48}. La inmunotoxina recombinante anti-MSLN SS1P ha demostrado especificidad y actividad antitumoral significativa *in vivo* en pacientes^{49,50}. En un ensayo de vacuna contra el cáncer de páncreas, los pacientes con ventaja de supervivencia tenían respuestas coherentes de células T CD8⁺ a MSLN asociadas con respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado inducida por vacuna⁵¹. Se demostró que los epítomos de células T específicos derivados de MSLN activan células T humanas para lisar de manera eficaz tumores humanos que expresan MSLN⁵². Por tanto, existe una fuerte evidencia de apoyo de que la inmunoterapia adoptiva que selecciona como diana MSLN puede seleccionar como diana tumores que expresan MSLN.

En determinadas realizaciones no limitativas, MSLN es mesotelina humana que tiene la secuencia con un n.º de

referencia de NCBI: AAV87530.1 (SEQ ID NO: 43), o fragmentos de la misma.

SEQ ID NO:43 se proporciona a continuación:

```
MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLFLSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG
VLANPPNISSLSRQLLGFP CAEVSGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE
PPEDLDALPLDLLLFLNPDA FSGPQACTHF FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW
GVRGSLSEADVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS CPGPLDQDQQ EAARAALQGG
GPPYGPSTWSVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS WRQPRTLIR
PRFRREVEKTACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD
VLKHKLDLYPQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ
VATLIDRFVKGRGQLDKDTL DTLTAFYPGY LCSLSPEELS SVPPSSIWAV RPQDLDTCDP
RQLDVLYPKARLAFQNMNGS EYFVKIQSFL GGAPTEDLKA LSQQNVSMDL ATFMKLRTDA
VLPLTVAEVQKLLGPHVEGL KAEERHRPVR DWILRQRQDD LDTLGLGLQG GIPNGYLVLD
LSVQEALSGTPCLLGGPGPVL TVLALLLAST LA [SEQ ID NO:43]
```

En determinadas realizaciones no limitativas, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR tiene una alta especificidad de unión, así como una alta afinidad de unión a MSLN humana. Por ejemplo, en tales realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR (incorporado, por ejemplo, en un scFv o un análogo del mismo) se une a MSLN humana con una constante de disociación (K_d) de aproximadamente 25 nM o menos. En algunas realizaciones, la K_d es de aproximadamente 24 nM, aproximadamente 23 nM, aproximadamente 22 nM, aproximadamente 21 nM o aproximadamente 20 nM o menos. En otras realizaciones, la K_d es de aproximadamente 15 nM o menos, tal como aproximadamente 14 nM, aproximadamente 13 nM, aproximadamente 12 nM o aproximadamente 11 nM. En otras realizaciones, la K_d es de aproximadamente 10 nM o menos, tal como aproximadamente 9 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 7 nM o aproximadamente 6 nM. En otras realizaciones, la K_d es de aproximadamente 5 nM o menos, tal como aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM o aproximadamente 1 nM o menos. En algunas realizaciones, la K_d es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nM, tal como aproximadamente de 2,5 a aproximadamente 15 nM, o aproximadamente de 5 a aproximadamente 10 nM. En algunas realizaciones, K_d es de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM, desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 20 nM, desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 15 nM, desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 10 nM, desde aproximadamente 5 nM hasta aproximadamente 10 nM, desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 5 nM, o desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 2 nM. En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular comprende un anticuerpo anti-mesotelina humano o una porción de unión a antígeno del mismo descrito en la patente estadounidense n.º 8.357.783. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular se deriva de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que se une a mesotelina humana, por ejemplo, anticuerpo m912 tal como se da a conocer en Feng (2009). El anticuerpo m912 se aisló a partir de una genoteca de Fab humano mediante cribado contra mesotelina recombinante. En otras realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular se deriva de Fab (por ejemplo, de genotecas de Fab humanas o de ratón).

La unión del dominio de unión a antígeno extracelular (realización, por ejemplo, en un scFv o un análogo del mismo) de un CAR dado a conocer actualmente a MSLN humana puede confirmarse, por ejemplo, mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis mediante FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento) o ensayo de inmunotransferencia de tipo Western. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo, o un scFv) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, el scFv puede marcarse radiactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo, 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse por tales medios como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o mediante autorradiografía. En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular seleccionado como diana por MSLN se marca con un marcador fluorescente. Los ejemplos no limitativos de marcadores fluorescentes incluyen proteína verde fluorescente (GFP), proteína azul fluorescente (por ejemplo, EBFP, EBFP2, azurita y mKalamal), proteína cian fluorescente (por ejemplo, ECFP, Cerulean y CyPet) y proteína amarilla fluorescente (por ejemplo, YFP, citrina, Venus y YPet). En una realización, el scFv humano seleccionado como diana por MSLN se marca con GFP.

En determinadas realizaciones no limitativas, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR dado a conocer actualmente reconoce o se une a MSLN humana con un nivel de MSLN de aproximadamente 1.000 o más sitios de unión a MSLN/célula. En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR dado a conocer actualmente reconoce o se une a MSLN humana con un nivel de MSLN de desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 50.000 sitios de unión a MSLN/célula. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR dado a conocer actualmente no reconoce o no se une a MSLN humana con un

nivel de expresión de MSLN de menos de 1.000 sitios de unión a MSLN/célula, por ejemplo, la MSLN humana expresada en tejidos normales, por ejemplo, tejidos normales de pleura, pericardio y peritoneo. En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR dado a conocer actualmente no reconoce o no se une a MSLN humana con un nivel de expresión de MSLN de más de 50.000 sitios de unión a MSLN/célula. En una realización, un scFV humano comprendido en un CAR dado a conocer actualmente reconoce o se une a MSLN humana con un nivel de expresión de MSLN de desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 50.000 sitios de unión a MSLN/célula. En una realización, un scFV humano comprendido en un CAR dado a conocer actualmente no reconoce o se une a MSLN humana con un nivel de expresión de MSLN de más de 50.000 o menos de 1.000 sitios de unión a MSLN/célula.

- 10 En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular comprende una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1 tal como se proporciona a continuación.

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLE
WIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY
CAREGKNGAFDIWQGTMTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGQTQYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTSGQAG [SEQ ID NO: 1]

- 15 La secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 se expone en SEQ ID NO:2 tal como se proporciona a continuación.

caggtgcagctgcaggagtcggcgccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctc	60
acctgcactgtctctggtggctccgtcagcagtggttagttactactggagctggatccgg	120
cagccccagggaagggaactggagtggtatgtatattacagtgaggagcaccaac	180
tacaaccctccctcaagagtcgagtcaccatattcagtagacacgtccaagaaccagttc	240
tccttgaagctgaagctctgtgacgcgtgcggacacggcgtgtattactgtgcgagagag	300
gggaagaatgggcttttgatattctgggccaagggaacaatggtcacgcgtctcttcagcc	360
tcaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggc	420
acagcgccctgggctgcctggtcaaggactacttcccgaaccggtgacggtgtcgtgg	480
aactcaggcgccctgaccagcgcggtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcagga	540
ctctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctac	600
atctgcaacgtgaatcacaaagccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagccaaa	660
tcttgtagacaaaactagtggtggcaggccggccac	693 [SEQ ID NO:2]

En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular comprende una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO:3 tal como se proporciona a continuación.

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI
YAASSLQSGVPSGFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPL
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY

- 20 ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:3]

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 se expone en SEQ ID NO:4 tal como se proporciona a continuación.

gacatccagatgaccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc	60
atcacttgccgggcaagtcagagcatttagcagctatttaaattggtatcagcagaaacca	120
gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaagtggggtcccatca	180
gggttcagtgagcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacct	240
gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccccgctcacttctggcgga	300
gggaccaagggtggagatcaaacgaactgtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgcca	360
tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctat	420
cccagagaggccaaagtacagtggaagtggtgataaacgcccctccaatcgggtaactccag	480
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctactgcctcagcagcaccctgacg	540
ctgagcaaagcagactacgagaaacacaaactctacgcctgcgaagtcaccatcagggc	600

ctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagt [SEQ ID NO:4]

- 25 En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular comprende una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:5 tal como se proporciona a continuación.

RHMQTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA
SSLQSGVPSGFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC [SEQ ID NO:5]

- 5 En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR dado a conocer actualmente comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). En una realización específica, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR dado a conocer actualmente comprende un scFv humano. En una realización, el scFv humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO:1. En otra realización, el scFv humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:6 tal como se proporciona a continuación.

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYI
YISGSTNYPNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGKNGAFD
IWQGTMVTVSSS [SEQ ID NO:6]

- 10 En una realización, el scFv humano comprende una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:3. En una realización, el scFv humano comprende una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:5.

En determinadas realizaciones, el scFv humano comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:7 tal como se proporciona a continuación.

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G
S Y Y W S W I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S
L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y
C A R E G K N G A F D I W G Q G T M V T V S S S G G G G S G G G
G S G G G G S R H Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A
S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G
V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q
Q S Y S T P L T F G G G T K V E I K G Q A G H H H H H G D Y K
D D D D K G [SEQ ID NO:7]

- 15 En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 se expone en SEQ ID NO:8 tal como se proporciona a continuación.

atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgcgcgagccg
caggtgcagctgcaggagtcggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacc
tgcaactgtctctggtggctccgctcagcagtggttagttactactggagctggatccggcagccc
ccaggaagggaactggagtggtatctattacagtgaggagcaccactacaacccc
tccctcaagagtcgagtcaccatattcagtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctg
agctctgtgaccgctgcggacacggcgtgtattactgtgcgagagaggggaagaatggggct
tttgatatctggggccaagggaatggtcaccgtctcttcaggtggaggcgggttcaggcggg
ggtggctctggcggtggcggaacacgacatcagatgacccagttctccctcctgtctgca
tctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaat
tggtatcagcagaaccagggaagccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaa
agtgggggtcccataaggttcagtggtgagtgatctgggacagatcttactctcaccatcagc
agtctgcaacctgaagatcttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccccgctcact
ttcgcgaggaggaccaaggtggagatcaaaccggactgcggccgca [SEQ ID NO:8]

- 20 En otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 se expone en SEQ ID NO:9 tal como se proporciona a continuación. La secuencia de ácido nucleico tal como se expone en SEQ ID NO:9 se optimiza de manera sintética para el uso de codones, lo que puede aumentar la expresión del CAR.

ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTGCCGCTGGCGCTGCTGCTGCATGCCGCGCGCCCG
CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCGGCCTGGTGAAACCGAGCGAAACCTGAGCCTGACC
TGCACCGTGAGCGCGGCAGCGTGAGCAGCGGCAGCTATTATTGGAGCTGGATTGCCAGCCG
CCGGGCAAAGGCCTGGAATGGATTGGCTATATTTATTATAGCGGCAGCACCAACTATAACCCG
AGCCTGAAAAGCCGCTGACCATTAGCGTGGATACCAGCAAAAACAGTTTAGCCTGAAACTG
AGCAGCGTGACCGCGCGGATACCGCGGTGATTATTGCGCGCGCAAGGCAAAAACGGCGCG
TTTGATATTTGGGGCCAGGGCACCATTGGTGACCGTGAGCAGCGCGCGCGCGGCAGCGCGCG
GGCGGCAGCGCGCGCGCGCGGCAGCCGCCATCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCG
AGCGTGGCGCATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTAGCAGCTATCTGAAC
TGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTATGCGGCGAGCAGCCTGCAG
AGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGC
AGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCAGCTATTATTGCCAGCAGAGCTATAGCACCCGCTGACC
TTTGCGGCGCGCACCAAGTGAAATTAACGCACCGCGCGCGCG [SEQ ID NO:9]

En aún otra realización, secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 se expone en SEQ ID NO:10 tal como se proporciona a continuación. La secuencia de ácido nucleico tal como se expone en SEQ ID NO:10 se optimiza de manera sintética para el uso de codones, lo que puede aumentar la expresión del CAR.

atggccCTCCCGGTAACGGCTCTGCTGCTTCCACTCGCACTGCTCTTGCTGCTGCCAGACCA
CAGGTCCAGCTGCAGGAGAGTGGGCCTGGACTGGTTAAGCCGAGTGAGACACTTTCCTTGACG
TGCACTGTGAGCGGGGAAGTGTGTCTCAGGTAGTTATTACTGGTCTGGATTGCCAGCCA
CCAGGAAAGGGACTGGAGTGGATAGGTTATATCTATTATTCTGGCAGCACTAATTACAATCCT
TCTCTCAAAAGTAGGGTGACAATTTTCACTGGATACTTCCAAAAATCAGTTTAGTCTGAAGCTC
AGCTCTGTGACAGCTGCTGATACTGCAGTTTACTACTGCGCCAGGGAGGGGAAGAATGGCGCC
TTCGATATTTGGGGACAGGGCACTATGGTGACTGTATCAAGCGGAGGCGGTGGCAGCGCGGG
GGAGGGAGTGGAGGCGCGGGTCTCGACATCAGATGACACAGAGCCATCATCACTTAGCGCC
AGCGTTGGCGACCGGGTTACGATAACATGCAGGGCTTCCAAATCTATCAGTTCTTATCTGAAC
TGGTATCAGCAGAAACAGGTAAGGCCCCCAAGCTGCTCATCTACGCAGCCTCATCCCTGCAG
AGCGGCGTCCCTAGTCGATTTTCCGGTAGTGGGTGAGGACAGATTTTACCCTGACTATCAGT
TCACTGCAGCCCGAGGACTTCGCGACATACTATTGCCAACAGTCTATAGTACACCCCTTGACA
TTTGCGGCGGGGACTAAAGTAGAAATTAACGCACCGcgggcgca [SEQ ID NO:10]

En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular comprende una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:11 o modificaciones conservadoras de la misma, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12 o modificaciones conservadoras de la misma, y una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:13 o modificaciones conservadoras de la misma. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular comprende una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:14 o modificaciones conservadoras de la misma, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:15 o modificaciones conservadoras de la misma, y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:16 o modificaciones conservadoras de la misma. En una realización a modo de ejemplo no limitativa, el dominio de unión a antígeno extracelular es un scFv humano derivado de un anticuerpo m912 anti-MSLN completamente humano tal como se da a conocer en Feng *et al.*, Mol. Cancer Therapy (2009);8(5):1113-1118.

Las SEQ ID NO: 11-16 se proporcionan a continuación:

GGSVSSGSYY [SEQ ID NO:11]
 IYYSGST [SEQ ID NO:12]
 AREGKNGAFDIW [SEQ ID NO:13]
 QSISSY [SEQ ID NO:14]
 AASS [SEQ ID NO:15]
 QQSYSTPLTF [SEQ ID NO:16]

Tal como se usa en el presente documento, el término “modificaciones de secuencia conservadoras” se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del CAR dado a conocer actualmente (por ejemplo, el dominio de unión a antígeno extracelular) que comprende la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y delecciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en el scFv humano del contenido dado a conocer actualmente mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Los aminoácidos pueden clasificarse en grupos según sus propiedades fisicoquímicas tales como carga y polaridad. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son unas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un aminoácido dentro del mismo grupo. Por ejemplo, los aminoácidos pueden clasificarse por carga: los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina, arginina, histidina, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, los aminoácidos de carga neutra incluyen alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Además, los aminoácidos pueden clasificarse por polaridad: los aminoácidos polares incluyen arginina (polar básica), asparagina, ácido aspártico (polar ácido), ácido glutámico (polar ácido), glutamina, histidina (polar básica), lisina (polar básica), serina, treonina y tirosina; los aminoácidos apolares incluyen alanina, cisteína, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina. Por tanto, uno o más residuos de aminoácido dentro de una región CDR pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácido del mismo grupo y el anticuerpo alterado puede someterse a prueba para determinar la función retenida (es decir, las funciones expuestas en (c) a (1) anterior) usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, no más de uno, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco residuos dentro de una secuencia especificada o una región CDR se alteran.

En determinadas realizaciones no limitativas, un dominio de unión a antígeno extracelular del CAR puede comprender un ligador que conecta la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del dominio de unión a antígeno extracelular. Tal como se usa en el presente documento, el término “ligador” se refiere a un grupo funcional (por ejemplo, compuesto químico o polipéptido) que se une de manera covalente a dos o más polipéptidos o ácidos nucleicos de manera que se conectan entre sí. Tal como se usa en el presente documento, un “péptido ligador” se refiere a uno o más aminoácidos usados para acoplar dos proteínas juntas (por ejemplo, para acoplar dominios V_H y V_L). En un ejemplo no limitativo, el ligador comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:17 tal como se proporciona a continuación.

GGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO:17]

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 se expone en SEQ ID NO: 18, que se proporciona a continuación:

GGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGGTGGGTCA [SEQ ID NO:18]

En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 se expone en SEQ ID NO: 19, que se proporciona a continuación.

GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCA [SEQ ID NO:19]

Además, el dominio de unión a antígeno extracelular puede comprender una secuencia líder o un péptido señal que dirige la proteína naciente al retículo endoplasmático. El péptido señal o la secuencia líder puede ser esencial si el CAR se va a glicosilar y a anclar en la membrana celular. La secuencia señal o secuencia líder puede ser una secuencia peptídica (aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, o aproximadamente 30 aminoácidos de longitud) presente en el extremo N-terminal de proteínas recién sintetizadas que dirigen su entrada a la ruta secretora. En los ejemplos no limitativos, la secuencia líder se une de manera covalente al extremo 5'-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular. En una realización, la secuencia líder comprende un polipéptido CD8 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO:20 tal como se proporciona a continuación.

MALPVTALLLPLALLLHAARP [SEQ ID NO:20]

La secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20 se expone en SEQ ID NO:21, que se proporciona a continuación:

ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCC [SEQ ID NO:21]

En determinadas realizaciones no limitativas, el dominio transmembrana del CAR comprende una hélice alfa hidrófoba que extiende al menos una porción de la membrana. Diferentes dominios transmembrana dan como resultado diferente estabilidad del receptor. Después del reconocimiento de antígenos, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula. Según el contenido dado a conocer actualmente, el dominio transmembrana del CAR puede comprender un polipéptido CD8, un polipéptido CD28, un polipéptido CD3 ζ , un polipéptido CD4, un polipéptido 4-1BB, un polipéptido OX40, un polipéptido ICOS, un polipéptido CTLA-4, un polipéptido PD-1, un polipéptido LAG-3, un polipéptido 2B4, un polipéptido BTLA, un péptido sintético (no basado en una proteína asociada con la respuesta inmunitaria), o una combinación de los mismos.

En una realización, el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8. El polipéptido CD8 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% homóloga a la secuencia que tiene un n.º de referencia de NCBI: NP_001139345.1 (SEQ ID NO:22) (la homología en el presente documento puede determinarse usando software convencional tal como BLAST o FASTA) tal como se proporciona a continuación, o fragmentos del mismo, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, el polipéptido CD8 puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO:22 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, y hasta 235 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, el polipéptido CD8 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 235, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 200, o 200 a 235 de SEQ ID NO:22. En una realización, el CAR del contenido dado a conocer actualmente es Mz, cuyo dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8. En otra realización, el CAR del contenido dado a conocer actualmente es MBBz, cuyo dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8. En una realización no limitativa, un CAR dado a conocer actualmente comprende un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD8 que tienen aminoácidos 137 a 209 de SEQ ID NO: 22.

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGA
AASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFS
HFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL
AGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSQDKPSLSARYV [SEQ ID NO:22]

Según el contenido dado a conocer actualmente, una “molécula de ácido nucleico CD8” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido CD8.

En una realización, el dominio transmembrana del CAR dado a conocer actualmente comprende un polipéptido CD28. El polipéptido CD28 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente 95%, el aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o el 100% homóloga a la secuencia que tiene un n.º de referencia de NCBI: P10747 o NP_006130 (SEQ ID No:23), o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, el polipéptido CD28 puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO:23 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 y hasta 220 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, el polipéptido CD28 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 220, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 200 o 200 a 220 de SEQ ID NO:23. En una realización, el CAR del contenido dado a conocer actualmente es M28z, que comprende un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD28, y un dominio intracelular que comprende una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido CD28. En una realización, el polipéptido CD28 comprendido en el dominio transmembrana y el dominio intracelular de M28z tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 117 a 220 de SEQ ID NO:23.

SEQ ID NO:23 se proporciona a continuación:

1 MLRLLALLNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61 SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNEVSTFYLO NLYVNQTDIY FCKIEVMPYP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLHSD YNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO:23]

Según el contenido dado a conocer actualmente, una “molécula de ácido nucleico CD28” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido CD28. En una realización, la molécula de ácido nucleico CD28 que codifica para el polipéptido CD28 comprendido en el dominio transmembrana y el dominio intracelular (por ejemplo, la región de señalización coestimuladora) de M28z comprende una secuencia de nucleótidos tal como se expone en

SEQ ID NO:24 tal como se proporciona a continuación.

```
ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATATC
CATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT
TGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCC
TTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATACATGAAC
ATGACTCCCCGCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGC
GACTTCGCAGCCTATCGCTCC [SEQ ID NO:24]
```

5 En determinadas realizaciones no limitativas, un CAR también puede comprender una región espaciadora que une el dominio de unión a antígeno al dominio transmembrana. La región espaciadora puede ser suficientemente flexible para permitir que el dominio de unión a antígeno se oriente en diferentes direcciones para facilitar el reconocimiento de antígenos. La región espaciadora puede ser la región bisagra de IgG1, o la región CH₂CH₃ de inmunoglobulina y porciones de CD3.

10 En determinadas realizaciones no limitativas, un dominio intracelular del CAR puede comprender un polipéptido CD3ζ, que puede activar o estimular una célula (por ejemplo, una célula del linaje linfóide, por ejemplo, una célula T). CD3ζ comprende 3 ITAM, y transmite una señal de activación a la célula (por ejemplo, una célula del linaje linfóide, por ejemplo, una célula T) después de unirse el antígeno. El polipéptido CD3ζ puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% homóloga a la secuencia que tiene un n.º de referencia de NCBI: NP_932170 (SEQ ID No: 25), o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, el polipéptido CD3ζ puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO: 25 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, y hasta 164 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, el polipéptido CD3ζ tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 164, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 150 o 150 a 164 de SEQ ID NO:25. En una realización, el polipéptido CD3ζ tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 52 a 164 de SEQ ID NO: 25. En una realización, el CAR del contenido dado a conocer actualmente es Mz, cuyo dominio intracelular comprende un polipéptido CD3ζ que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 52 a 164 de SEQ ID NO: 25. En una realización, el CAR del contenido dado a conocer actualmente es M28z, cuyo dominio intracelular comprende un polipéptido CD3ζ que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 52 a 164 de SEQ ID NO:25. En una realización, el CAR del contenido dado a conocer actualmente es MBBz, cuyo dominio intracelular comprende un polipéptido CD3ζ que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 52 a 164 de SEQ ID NO: 25.

SEQ ID NO: 25 se proporciona a continuación:

```
1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61 APAYQQGQNG LYNELNLGRR EYDVLDRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGY YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG EERRRGKHG DYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO: 25]
```

30 Según el contenido dado a conocer actualmente, una “molécula de ácido nucleico CD3ζ” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido CD3ζ. En una realización, la molécula de ácido nucleico CD3ζ que codifica para el polipéptido CD3ζ comprendido en el dominio intracelular de los CAR dados a conocer actualmente (por ejemplo, Mz, M28z o MBBz) comprende una secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 26 tal como se proporciona a continuación.

```
AGAGTGAAGTTACAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTC
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAAT
GAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC
CGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC
35 TACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA [SEQ ID NO: 26]
```

40 En determinadas realizaciones no limitativas, un dominio intracelular del CAR comprende además al menos una región de señalización coestimuladora que comprende al menos una molécula coestimuladora, que puede proporcionar una activación de linfocitos óptima. Tal como se usa en el presente documento, “moléculas coestimuladoras” se refiere a moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de linfocitos a antígeno. La al menos una región de señalización coestimuladora puede incluir un polipéptido CD28, un polipéptido 4-1BB, un polipéptido OX40, un polipéptido ICOS, un polipéptido PD-1, un polipéptido CTLA-4, un polipéptido LAG-3, un polipéptido 2B4, un

polipéptido BTLA, un péptido sintético (no basado en una proteína asociada con la respuesta inmunitaria), o una combinación de los mismos. La molécula coestimuladora puede unirse a un ligando coestimulador, que es una proteína expresada en la superficie celular que tras la unión a su receptor produce una respuesta coestimuladora, es decir, una respuesta intracelular que efectúa la estimulación proporcionado cuando un antígeno se une a su molécula de CAR. Los Ligandos coestimuladores, incluyen, pero no se limitan a CD80, CD86, CD70, OX40L, 4-1BBL, CD48, TNFRSF14 y PD-L1. Como un ejemplo, un ligando de 4-1BB (es decir, 4-1BBL) puede unirse a 4-1BB (también conocido como "CD137") para proporcionar una señal intracelular que en combinación con una señal de CAR induce una función celular efectora de la célula T-CAR⁺. Los CAR que comprenden un dominio intracelular que comprende una región de señalización coestimuladora que comprende 4-1BB, ICOS o DAP-10 se dan a conocer en el documento U.S. 7.446.190 (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica para 4-1BB se expone en SEQ ID No: 15, la secuencia de nucleótidos que codifica para ICOS se expone en SEQ ID No: 16, y la secuencia de nucleótidos que codifica para DAP-10 se expone en SEQ ID No: 17 en el documento U.S. 7.446.190),. En algunas realizaciones, el dominio intracelular del CAR comprende una región de señalización coestimuladora que comprende dos moléculas coestimuladoras: CD28 y 4-1BB (véase, Sadelain, *et al.*, Cancer Discovery, OF1-11, (2013)), o CD28 y OX40.

4-1BB puede actuar como un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y tiene actividad estimuladora. El polipéptido 4-1BB puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o el 100% homóloga a la secuencia que tiene un n.º de referencia de NCBI: P41273 o NP_001552 (SEQ ID NO:27) o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, el polipéptido 4-1BB puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO: 27 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 y hasta 255 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, el polipéptido 4-1BB tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 255, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 200 o 200 a 255 de SEQ ID NO: 27. En una realización, el CAR del contenido dado a conocer actualmente es MBBz, cuyo dominio intracelular comprende un polipéptido 4-1BB.

SEQ ID NO: 27 se proporciona a continuación:

```
1  MGNSCYNIVA TLLLVNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61  TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241 CSCRFPPEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 27]
```

Según el contenido dado a conocer actualmente, una "molécula de ácido nucleico 4-1BB" se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido 4-1BB.

Un polipéptido OX40 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o el 100% homóloga a la secuencia que tiene un n.º de referencia de NCBI: P43489 o NP_003318 (SEQ ID No: 28), o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos.

SEQ ID NO: 28 se proporciona a continuación:

```
1  MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
61  NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCR CR AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ
181 GPPARPITVQ PTEAWPTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI [SEQ ID NO: 28]
```

Según el contenido dado a conocer actualmente, una "molécula de ácido nucleico OX40" se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido OX40.

Un polipéptido ICOS puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o el 100% homóloga a la secuencia que tiene un n.º de referencia de NCBI: NP_036224 (SEQ ID NO: 29) o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos.

SEQ ID NO: 29 se proporciona a continuación:

1 MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQ
61 ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK
121 VTLTGGLYLI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [SEQ ID NO: 29]

Según el contenido dado a conocer actualmente, una "molécula de ácido nucleico ICOS" se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido ICOS.

- 5 CTLA-4 es un receptor inhibidor expresado por células T activadas, que cuando se acopla con sus ligandos correspondientes (CD80 y CD86; B7-1 y B7-2, respectivamente), media la inhibición de células T activadas o anergia. En ambos estudios preclínicos y clínicos, el bloqueo de CTLA-4 mediante la infusión de anticuerpos sistémica, sin embargo, mejora la respuesta antitumoral endógena, en el ámbito clínico, con toxicidades imprevistas significativas.
- 10 CTLA-4 contiene un dominio V extracelular, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Se han caracterizado variantes de corte y empalme alternativas, que codifican para diferentes isoformas. La isoforma unida a la membrana funciona como un homodímero interconectado por un enlace disulfuro, mientras que la isoforma soluble funciona como un monómero. El dominio intracelular es similar al de CD28, en que no tiene actividad catalítica intrínseca y contiene un motivo YVKM que puede unirse a PI3K, PP2A y SHP-2 y un motivo rico en prolina que puede unirse a proteínas que contienen SH3. Un papel de CTLA-4 en la inhibición de respuestas de células T parece ser directamente a través de la desforilación de SHP-2 y PP2A de proteínas de señalización proximales de TCR tales como CD3 y LAT. CTLA-4 también puede afectar a la señalización indirectamente a través de la competencia con CD28 por la unión a CD80/86. CTLA-4 también ha demostrado que se une y/o interacciona con PI3K, CD80, AP2M1 y PPP2R5A.
- 15
- 20 Según el contenido dado a conocer actualmente, un polipéptido CTLA-4 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% homóloga a SEQ ID NO: 30 (la homología puede determinarse en el presente documento usando software convencional tal como BLAST o FASTA) o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, un polipéptido CTLA-4 puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO: 30 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 y hasta 223 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, el polipéptido CTLA-4 tiene una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 223, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 140, 141 a 161, 162 a 182, 183 a 223, 141 a 223, 162 a 223 o
- 30 183 a 223 de SEQ ID NO: 30. En una realización, el polipéptido CTLA-4 tiene una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 183 a 223 de SEQ ID NO: 30. En determinadas realizaciones, el dominio intracelular del CAR comprende una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido CTLA-4 que tiene una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 183 a 223 de SEQ ID NO: 30. En determinadas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende un polipéptido CTLA-4 que tiene una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 162 a 182 de SEQ ID NO: 30.
- 35

SEQ ID NO: 30 se proporciona a continuación:

1 MACLGFORHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS RGIASFVCEY
61 ASPGKATEVRVTVLRLQADSQ VTEVCAATYM MCNELTFLDD SICTGTSSGN QVNLTIQGLR
121 AMDTGLYICK VELMYPPPPY LGIGNGTQIY VIDPEPCPDS DFLWLILAAV SSGLFFYSFL
181 LTAVSLSKML KKRSPLTTGV YVKMPPTPE CEKQFQPYFI PIN

Según el contenido dado a conocer actualmente, una "molécula de ácido nucleico CTLA-4" se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido CTLA-4.

- 40 PD-1 es un regulador inmunitario negativo de células T activadas tras acoplarse con sus correspondientes ligandos PD-L1 y PD-L2 expresados en macrófagos endógenos y células dendríticas. PD-1 es una proteína de la membrana de tipo I de 268 aminoácidos. PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, que son miembros de la familia B7. La estructura de la proteína comprende un dominio IgV extracelular seguido por una región transmembrana y una cola intracelular. La cola intracelular contiene dos sitios de fosforilación ubicados en un motivo inhibidor del inmunorreceptor basado en tirosina y un motivo activador del inmunorreceptor basado en tirosina, que PD-1 regula negativamente señales de TCR. Las fosfatasa SHP-1 y SHP-2 se unen a la cola citoplasmática de PD-1 tras la unión al ligando. La regulación por incremento de PD-L1 es un mecanismo las células tumorales pueden eludir el sistema inmunitario del huésped. En ensayos preclínicos y clínicos, el bloqueo de PD-1 por respuestas antitumorales inducidas por anticuerpos antagonistas mediadas a través del sistema inmunitario endógeno del huésped.
- 45
- 50 Según el contenido dado a conocer actualmente, un polipéptido PD-1 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente

el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% homóloga a SEQ ID NO: 31 o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, un polipéptido PD-1 puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO: 31 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 y hasta 288 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, un polipéptido PD-1 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 288, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 144, 145 a 170, 171 a 191, 192 a 288, 145 a 288, 171 a 288 o 192 a 288 de SEQ ID NO:31. En una realización, el polipéptido PD-1 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 192 a 288 de SEQ ID NO: 31. En determinadas realizaciones, el dominio intracelular del CAR comprende una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido PD-1 que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 192 a 288 de SEQ ID NO: 31. En determinadas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende un polipéptido PD-1 que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 171 a 191 de SEQ ID NO: 31.

SEQ ID NO: 31 se proporciona a continuación:

```
1  mgipgapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtegdna tftcsfsnts
61  esfvlwnwrm spsnqtdkla afpedrsqpg qdcfrfrvtql pngrdfhmsv vrarrndsgt
121 ylcgaisslap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtiv vgvvgllgs
181 lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygelfdqw rektpeppvp
241 cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl
```

Según el contenido dado a conocer actualmente, una “molécula de ácido nucleico PD-1” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido PD-1.

Proteína de activación de linfocitos 3 (LAG-3) es un regulador inmunitario negativo de células inmunitarias. LAG-3 pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y contiene 4 dominios de tipo Ig extracelulares. El gen LAG3 contiene 8 exones. Los datos de secuencia, organización de exones/intrones y la localización cromosómica indican una estrecha relación de LAG3 con CD4. LAG3 también se ha denominado CD223 (agrupación de diferenciación 223).

Según el contenido dado a conocer actualmente, un polipéptido LAG-3 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% homóloga a SEQ ID NO: 32 o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, un polipéptido LAG-3 puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO: 32 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 y hasta 525 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, un polipéptido LAG-3 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 525, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 350, 350 a 400, 400 a 420, 421 a 450, 451 a 471, 472 a 525, 421 a 525, 451 a 525 o 472 a 525 de SEQ ID NO: 32. En una realización, el polipéptido LAG-3 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 472 a 525 de SEQ ID NO: 32. En determinadas realizaciones, el dominio intracelular del CAR comprende una región coestimuladora que comprende un polipéptido LAG-3 que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 472 a 525 de SEQ ID NO: 32. En determinadas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende un polipéptido LAG-3 que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 451 a 471 de SEQ ID NO: 32.

SEQ ID NO: 32 se proporciona a continuación:

```
1  mweaqflgll flqplwvapv kplqpgaevp vwwaqegapa qlpcstipl qdlsllrrag
61  vtqwghqpdsg ppaaapghpl apgphpaaps swgprprryt vlsvgpgglr sgrlplqprv
121 qlidergrqrg dfsliwlrpar radageyraa vhlrdralso rlrirlgqas mtasppgsrlr
181 asdwilnsc fsrpdrrpasv hwfrnrgqgr vpvresphhh laesflflpq vspmdsgpwg
241 cilttyrdgfn vsimynltvl glepptpltv yagagsrvgl pcrlpagvt rsfltakwtp
301 pgggpdllvt gdngdftlrl edvsqaqagt ytchihlqeq qlnatvtlai itvtpkfsfgs
361 pgsllgkllce vtpvsgqerf vwssldtspq rsfsgpwlea qeaqlsqpw qcqlyqgerl
421 lgaavyftel sspgaqrsg rpgalpaghl llflilgvls llllvtgafg fhlwrrqwrp
481 rrfsaleggi hppqaqskie eleqepepep epepepepep epeql
```

Según el contenido dado a conocer actualmente, una “molécula de ácido nucleico LAG-3” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido LAG-3.

El receptor de linfocitos citolíticos naturales 2B4 (2B4) media destrucción celular no restringida por MHC en linfocitos

citolíticos naturales y subconjuntos de células T. Hasta ahora, la función de 2B4 todavía está bajo investigación, ya que se cree que la isoforma 2B4-S es un receptor de activación, y la isoforma 2B4-L se cree que es un regulador inmunitario negativo de células inmunitarias. 2B4 se acopla tras la unión a su ligando de alta afinidad, CD48. 2B4 contiene un motivo activador basado en tirosina, un activador molecular que permite a la proteína asociarse con diversas fosfatasa. 2B4 también se ha denominado CD244 (agrupación de diferenciación 244).

Según el contenido dado a conocer actualmente, un polipéptido 2B4 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% homóloga a SEQ ID NO: 33 o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, un polipéptido 2B4 puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO: 33 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 y hasta 370 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, un polipéptido 2B4 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 370, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 215, 216 a 229, 230 a 250, 251 a 370, 216 a 370, 230 a 370, o 251 a 370 de SEQ ID NO: 33. En una realización, el polipéptido 2B4 tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 251 a 370 de SEQ ID NO: 33. En determinadas realizaciones, el dominio intracelular del CAR comprende una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido 2B4 que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 251 a 370 de SEQ ID NO: 33. En determinadas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende un polipéptido 2B4 que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 230 a 250 de SEQ ID NO: 33.

SEQ ID NO: 33 se proporciona a continuación:

```
1 mlgqvvtlil llllkvyqgk gcqgsadhv sisgvplqlq pnsiqtkvds iawkklpsq
61 ngfhhilkwe ngsipstns drfsfivknl sllikaagqg dsglyclevt sisgkvqtat
121 fqvfvfesll pdkvekprlq gqgkildrgr cgvalscslvs rdgnvsyawy rgskliqtag
181 nltyldeevd ingthtytcn vsnpvswesh tlnltqdcqn ahqefrfwpf lviivilsal
241 flgtlacfcv wrrkrkekqs etspkeflti yedvkdltktr rnhegeqtfp gggstiymsi
301 qsqssaptsq epaytlysli qsrksgrk rnhepsfnst iyevigksqp kaqnparlsr
361 kelenfdvys
```

Según el contenido dado a conocer actualmente, una "molécula de ácido nucleico 2B4" se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido 2B4.

La expresión del atenuador de linfocitos B y T (BTLA) se induce durante la activación de células T, y BTLA permanece expresado en células Th1 pero no en células Th2. Como PD1 y CTLA4, BTLA interactúa con un homólogo de B7, B7H4. Sin embargo, a diferencia de PD-1 y CTLA-4, BTLA presenta inhibición de células T a través de la interacción con receptores de la familia de la necrosis tumoral (TNF-R), no sólo la familia B7 de receptores de la superficie celular. BTLA es un ligando para la superfamilia de factores de necrosis tumoral (receptor), miembro 14 (TNFRSF14), también conocido como mediador de entrada del virus del herpes (HVEM). Los complejos BTLA-HVEM regulan de manera negativa las respuestas inmunitarias de células T. La activación de BTLA ha demostrado que inhibe la función de células T específicas de cáncer CD8⁺ humanas. BTLA también se denomina CD272 (agrupación de diferenciación 272).

Según el contenido dado a conocer actualmente, un polipéptido BTLA puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100% homóloga a SEQ ID NO: 34 o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos. En realizaciones no limitativas, un polipéptido BTLA puede tener una secuencia de aminoácidos que es una porción consecutiva de SEQ ID NO: 34 que tiene al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50 y hasta 289 aminoácidos de longitud. Alternativa o adicionalmente, en diversas realizaciones no limitativas, un polipéptido BTLA tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 289, 1 a 50, 50 a 100, 100 a 134, 135 a 157, 158 a 178, 179 a 289, 135 a 289, 158 a 289, o 179 a 289 de SEQ ID NO: 34. En una realización, el polipéptido BTLA tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 179 a 289 de SEQ ID NO: 34. En determinadas realizaciones, el dominio intracelular del CAR comprende una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido BTLA que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 179 a 289 de SEQ ID NO: 34. En determinadas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR comprende un polipéptido BTLA que tiene una secuencia de aminoácidos de aminoácidos 158 a 178 de SEQ ID NO: 34.

SEQ ID NO: 34 se proporciona a continuación:

```

1 MKTLPAMIGT GKLEWVFFLI PYLDIWNHIG KESCDVQLYI KRQSEHSILA GDPFELECPV
61 KYCANRPHVT WCKLNGTTCV KLEDRTQSWK EEKNISFFIL HFEPVLPNDN GSYRCSANFQ
121 SNLIESHSTT LYVTDVKSAS ERPSKDEMAS RPWLLYRLLP LGGLPLLITT CFCLFCCLRR
181 HQGKQNELSD TAGREINLVD AHLKSEQTEA STRQNSQVLL SETGIYDNDP DLCFRMQEGS
241 EYVSNPCLEE NKPGIVYASL NHSVIGPNSR LARNVKEAPT EYASICVRS

```

Según el contenido dado a conocer actualmente, una “molécula de ácido nucleico BTLA” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido BTLA.

- 5 En una realización, el CAR es Mz, que comprende una región extracelular de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina humana, un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD8, y un dominio intracelular que comprende un polipéptido CD3 ζ (véase, por ejemplo, la figura 2). Mz también comprende una secuencia líder unida de manera covalente al extremo 5'-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular. La secuencia líder comprende un polipéptido CD8 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.
- 10 En una realización, el CAR es M28z, que comprende una región extracelular de unión a antígeno que se une específicamente a mesotelina humana, un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD28, y un dominio intracelular que comprende un polipéptido CD3 ζ y una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido CD28 (véase, por ejemplo, la figura 2). M28z también comprende una secuencia líder unida de manera covalente al extremo 5'-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular. La secuencia líder comprende un polipéptido CD8 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.
- 15 En algunas realizaciones, el CAR comprende M28z y un ligando coestimulador que es IL-12, por ejemplo, M28z⁺IL-12 tal como se muestra en la figura 24E. IL-12 puede unirse de manera covalente al extremo 3'-terminal del dominio intracelular de M28z. En algunas realizaciones, el CAR comprende M28z y un ligando coestimulador que es 4-1BBL, por ejemplo, M28z⁺4-1BBL tal como se muestra en la figuras 24C y 24D. 4-1BBL puede unirse de manera covalente al extremo 5'-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular de M28z, tal como se muestra en la figura 24D.
- 20 Alternativamente, 4-1BBL puede unirse de manera covalente al extremo 3'-terminal del dominio intracelular de M28z, tal como se muestra en la figura 24C.
- En una realización, el CAR es MBBz, que comprende una región extracelular de unión a antígeno que se une específicamente a mesotelina humana, un dominio transmembrana que comprende un polipéptido CD8, y un dominio intracelular que comprende un polipéptido CD3 ζ y una región de señalización coestimuladora que comprende un polipéptido 4-1BB (véanse, por ejemplo, las figuras 19 y 24B). MBBz también comprende una secuencia líder unida de manera covalente al extremo 5'-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular. La secuencia líder comprende un polipéptido CD8 que comprende aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.
- 25 En algunas realizaciones, el CAR del contenido dado a conocer actualmente puede comprender además un promotor inducible, para expresar secuencias de ácido nucleico en células humanas. Los promotores para su uso en la expresión de genes de CAR pueden ser un promotor constitutivo, tal como promotor de ubiquitina C (UbiC).

- Los CAR específicos de MSLN han demostrado eficacia contra el cáncer de ovario, mesotelioma pleural maligno (MPM) y cáncer de mama triple negativo (TNBC) tanto en ámbitos *in vitro* como *in vivo* ⁵⁴⁻⁵⁸. Dos ensayos clínicos de fase I han usado células T transducidas con CAR anti-MSLN. Un ensayo clínico de fase I de NCI (NCT01583686) trata cánceres metastásicos o inoperables que expresan MSLN con células T-CAR, en combinación con quimioterapia mielosupresora y/o aldesleucina (un análogo de IL-2) para aumentar la persistencia de células T-CAR. Un ensayo clínico de fase I de la Universidad de Pensilvania (NCT01355965) suministra a pacientes con mesotelioma de 1 a 3 dosis de células T-CAR seleccionadas como diana por MSLN transfectadas con ARN. En el último estudio, una respuesta de anticuerpos humanos anti-IgG de ratón (HAMA) se observó en el tercer paciente tratado (Cancer Immunol Res, 7 de abril de 2013). A diferencia de los MSLN-CAR en los ensayos clínicos de NCI y la U. de Pensilvania, en una realización, el CAR dirigido a MSLN dado a conocer actualmente se deriva de un Fab humano⁵³, y por tanto, proporciona un riesgo muy disminuido de inmunogenicidad, en comparación con los CAR derivados de anticuerpos murinos (véase (véase Maus *et al.*, Cancer Immunol Res (2003);1(1):26-31), que informa de que la posible inmunogenicidad de los CAR derivados de anticuerpos murinos puede ser un problema de seguridad para los CAR de ARNm). Los CAR dirigidos a MSLN dados a conocer actualmente pueden transducir tanto células T CD4⁺ como CD8⁺ células, y, por tanto, la transducción de las células T de un paciente con CAR genera tanto respuestas auxiliares como de CTL, dando como resultado una respuesta antitumoral sostenida.
- 35
- 40
- 45

III. Células inmunorreactivas

- 50 El contenido dado a conocer actualmente proporciona células inmunorreactivas que expresan un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en las que el dominio de unión a antígeno extracelular se une específicamente a mesotelina humana, tal como se describió anteriormente. El contenido dado a conocer actualmente también proporciona métodos de uso de tales células para el tratamiento de una enfermedad que, por ejemplo, requiere una respuesta inmunitaria mejorada. Las células

inmunorreactivas del contenido dado a conocer actualmente pueden ser células del linaje linfóide. El linaje linfóide, que comprende células B, T y linfocitos citolíticos naturales (NK), prevé la producción de anticuerpos, regulación del sistema inmunitario celular, detección de agentes exógenos en la sangre, detección de células ajenas al huésped, y similares. Los ejemplos no limitativos de células del linaje linfóide incluyen células T, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citotóxicos (CTL), células T reguladoras, células madre embrionarias y células madre pluripotentes (por ejemplo, las que pueden diferenciarse de las células linfoides). Las células T pueden ser linfocitos que maduran en el timo y son responsables principalmente de la inmunidad mediada por células. Las células T se implican en el sistema inmunitario adaptativo. Las células T del contenido dado a conocer actualmente pueden ser cualquier tipo de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria (incluyendo células T de memoria central, células T de memoria similares a células madre (o células T de memoria similares a tallo), y dos tipos de células T de memoria efectoras: por ejemplo, células T_{EM} y células T_{EMRA}), células T reguladoras (también conocidas como células T supresoras), linfocitos T citolíticos naturales, células T invariantes asociadas a mucosas, y células T $\gamma\delta$. En algunas realizaciones, las células T que expresan CAR expresan Foxp3 para lograr y mantener un fenotipo regulador T. Los linfocitos citolíticos naturales (NK) pueden ser linfocitos que son parte de la inmunidad mediada por células y actúan durante la respuesta inmunitaria innata. Los linfocitos citolíticos naturales no requieren activación previa para realizar su efecto citotóxico en células diana. Las células T citotóxicas (CTL o linfocitos T citolíticos) son un subconjunto de linfocitos T que pueden inducir la muerte de células tumorales o somáticas infectadas.

Las células inmunorreactivas del contenido dado a conocer actualmente pueden expresar un dominio de unión a antígeno extracelular (por ejemplo, un scFV humano, un Fab que se reticula opcionalmente o un F(ab)₂) que se une específicamente a mesotelina humana, para el tratamiento o la prevención de una neoplasia. Tales células inmunorreactivas pueden administrarse a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que lo necesita para el tratamiento o la prevención de un tumor sólido (por ejemplo, mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, tumor pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago y/o colangiocarcinoma). En una realización, la célula inmunorreactiva es una célula T. La célula T puede ser una célula T CD4⁺ o una célula T CD8⁺. En una realización, la célula T es una célula T CD4⁺.

Una célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente puede comprender además al menos un ligando coestimulador exógeno, de manera que la célula inmunorreactiva coexpresa o se induce a coexpresar de manera exógena el CAR específico de mesotelina y el al menos un ligando coestimulador exógeno. La interacción entre el CAR específico de mesotelina y al menos un ligando coestimulador proporciona una señal no específica de antígeno importante para la activación completa de una célula inmunorreactiva (por ejemplo, célula T). Los ligandos coestimuladores incluyen, sin limitación, miembros de la superfamilia de factores de necrosis tumoral (TNF), y ligandos de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig). El TNF es una citocina implicada en la inflamación sistémica y estimula la reacción de fase aguda. Su principal papel está en la regulación de células inmunitarias. Los miembros de la superfamilia de TNF comparten varias características comunes. La mayoría de los miembros de la superfamilia de TNF se sintetizan como proteínas transmembrana de tipo II (extremo C-terminal extracelular) que contienen un segmento citoplásmico corto y una región extracelular relativamente larga. Los miembros de la superfamilia de la TNF incluyen, sin limitación, factor de crecimiento nervioso (NGF), CD40L (CD40L)/CD154, CD137L/4-1BBL, TNF- α , CD134L/OX40L/CD252, CD27L/CD70, ligando de Fas (FasL), CD30L/CD153, factor de necrosis tumoral beta (TNF β)/linfotóxina alfa (LT α), linfotóxina beta (LT β), factor de activación de células CD257/B (BAFF)/Blys/THANK/Tall-1, ligando de los receptores de TNF inducidos por glucocorticoides (GITRL, y ligando que induce la apoptosis relacionada con TNF (TRAIL), LIGHT (TNFSF14). La superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) es un gran grupo de proteínas de la superficie celular y solubles que se implican en los procesos de reconocimiento, unión o adhesión de células. Estas proteínas comparten características estructurales con las inmunoglobulinas – poseen un dominio de inmunoglobulina (pliegue). Los ligandos de la superfamilia de las inmunoglobulinas incluyen, sin limitación, CD80 y CD86, ambos ligandos para CD28, PD-L1/B7-H1) que son ligandos para PD-1.

En algunas realizaciones, el al menos un ligando coestimulador se selecciona del grupo que consiste en 4-1BBL, CD80, CD86, CD70, OX40L, CD48, TNFRSF14, PD-L1, y combinaciones de los mismos. En una realización, el ligando coestimulador es 4-1BBL. En una realización no limitativa, una célula inmunorreactiva coexpresa M28z y 4-1BBL, por ejemplo, M28z*4-1BBL tal como se muestra en las figuras 24C y 24D. 4-1BBL puede unirse de manera covalente al extremo 5'-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular de M28z, tal como se muestra en la figura 24D. Alternativamente, 4-1BBL puede unirse de manera covalente al extremo 3'-terminal del dominio intracelular de M28z, tal como se muestra en la figura 24C.

Un polipéptido OX40L puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o el 100% homóloga a la secuencia que tiene un n.º de referencia de NCBI: BAB18304 o NP_003317 (SEQ ID NO: 35), o fragmentos de la misma, y/o puede comprender opcionalmente hasta una o hasta dos o hasta tres sustituciones conservadoras de aminoácidos.

SEQ ID NO: 35 se proporciona a continuación:

```

1 mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv igglglllcf tyiclhfsal qvshrypriq
61 sikvqfteyk kekqfilsq kedeimkvqn nsviincdgf ylislkgyfs qevnislhyq
121 kdeepflqqlk kvrsvnslmv asltykdkvy lnvtttdntsl ddfhvnggel ilihqnpgef
181 cvl

```

Según el contenido dado a conocer actualmente, una “molécula de ácido nucleico OX40L” se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido OX40L.

Además, una célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente puede comprender además al menos una citocina exógena, de manera que la célula inmunorreactiva coexpresa o se induce para coexpresar de manera exógena el CAR específico de mesotelina y la al menos una citocina. En algunas realizaciones, la al menos una citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-21. En una realización, la citocina es IL-12. En una realización no limitativa, una célula inmunorreactiva coexpresa M28z e IL-12, por ejemplo, M28z*IL-12 tal como se muestra en la figura 24E. IL-12 puede unirse de manera covalente al extremo 3'-terminal del dominio intracelular de M28z.

Adicionalmente, las células inmunorreactivas pueden expresar un segundo CAR que se une a un antígeno diferente que la mesotelina humana. Los CAR que pueden usarse como un segundo CAR en combinación con el CAR específico de mesotelina en el contenido dado a conocer actualmente incluyen los descritos en Sadelain, *et al.*, “The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design” Cancer Discovery, OF1-11, (2013), Chicaybam, *et al.*, (2011), Brentjens *et al.* Nature Medicine 9:279- 286 (2003), y el documento U.S. 7.446.190, por ejemplo, CAR dirigidos a CD19 (véanse los documentos U.S. 7.446.190; U.S. 2013/0071414.), CAR dirigidos a HER2 (véase Ahmed, *et al.*, Clin Cancer Res., 2010), CAR dirigidos a MUC16 (véase Chekmasova, *et al.*, 2011), CAR dirigidos a antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) (por ejemplo, Zhong, *et al.*, Molecular Therapy, 18(2):413-420 (2010)). Las células inmunorreactivas que expresan dos o más receptores de reconocimiento de antígenos (por ejemplo, CAR) se describen en el documento WO 2014/055668.

El antígeno puede ser un antígeno tumoral o patógeno. Cualquier antígeno tumoral adecuado (péptido antigénico) es adecuado para su uso en las realizaciones relacionadas con tumores descritas en el presente documento. Las fuentes de antígeno tumoral incluyen, pero no se limitan a proteínas cancerosas. El antígeno puede expresarse como un péptido o como una proteína intacta o porción de la misma. La proteína intacta o una porción de la misma puede ser nativa o mutagenizada. Los antígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y antígeno de células madre de próstata (PCSA). En algunas realizaciones, el antígeno tumoral puede ser anhidrasa carbónica IX (CA1X), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, un antígeno de una célula infectada por citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, un antígeno de la superficie celular), glicoproteína 2 epitelial (EGP 2), glicoproteína 40 epitelial (EGP-40), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), tirosina-proteína cinasas receptoras erb- B2,3,4, proteína de unión a folatos (FBP), receptor de acetilcolina fetal (AChR), receptor a de folatos, gangliósido G2 (GD2), gangliósido G3 (GD3), receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), subunidad alfa 2 del receptor de interleucina 13 (IL-13R α 2), cadena ligera κ , receptor de dominio de inserto de cinasa (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), molécula de adhesión celular L1 (L1CAM), familia A de antígenos de melanoma, 1 (MAGE-A1), mucina 16 (Muc-16), mucina 1 (Muc-1), ligandos de NKG2D, antígeno de cáncer de testículo NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), factor de crecimiento endotelial vascular R2 (VEGF-R2), proteína tumoral de Wilms (WT-1), receptor transmembrana de tirosina-proteína cinasa de tipo 1 (ROR1), o una combinación de los mismos.

Los antígenos patógenos adecuados para su uso en el tratamiento de infección por patógenos u otra enfermedad infecciosa, por ejemplo, en un sujeto inmunodeprimido incluyen, sin limitación, antígenos virales presentes en citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la gripe. Las células inmunorreactivas que incluyen un segundo CAR que selecciona como diana un antígeno viral puede usarse para tratar enfermedades virales. En una realización no limitativa, el CAR dirigido a mesotelina dado a conocer actualmente y un segundo CAR que se une a un antígeno CMV se coexpresan en las células inmunorreactivas (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) puede usarse para tratar CMV.

Los linfocitos humanos específicos de mesotelina o dirigidos a mesotelina que pueden usarse en los métodos del contenido dado a conocer actualmente incluyen, sin limitación, linfocitos donadores periféricos, por ejemplo, los dados a conocer en Sadelain, M., *et al.* 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45 (que da a conocer linfocitos donadores periféricos modificados genéticamente para expresar CAR), en Morgan, R.A., *et al.* 2006 Science 314:126-129 (que da a conocer linfocitos donadores periféricos modificados genéticamente para expresar un complejo antígeno tumoral de longitud completa-receptor de células de T de reconocimiento que comprende el heterodímero α y β), en Panelli, M.C., *et al.* 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., *et al.* 2000 J Immunol 164:4382-4392 (que da a conocer cultivos de linfocitos derivados de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) en biopsias tumorales), y en Dupont, J., *et al.* 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., *et al.* 2003 Blood 102:2498-2505 (que da a conocer leucocitos de sangre periférica específicos de antígeno expandidos *in vitro* de manera selectiva que emplean células

presentadoras de antígeno artificiales (AAPC) o células dendríticas pulsadas). Las células inmunorreactivas (por ejemplo, células T) pueden ser autólogas, no autólogas (por ejemplo, alogénicas), o derivadas *in vitro* a partir de células progenitoras o madre modificadas por ingeniería.

Los ensayos pueden usarse para comparar la influencia de la señalización coestimuladora sobre la mejora de la proliferación de células T transducidas por MSLN-CAR, la función efectora y la acumulación tras la estimulación de antígeno repetida (semanal). Los linfocitos de sangre periférica (PBL) pueden recogerse de voluntarios sanos bajo un protocolo aprobado por IRB y transducirse. La eficiencia de transferencia de genes puede monitorizarse por análisis mediante FACS para cuantificar la fracción de células T GFP⁺ (transducidas) y/o por PCR cuantitativa. Usando un sistema de cultivo conjunto bien establecido,^{16,25,98} puede determinarse si las AAPC de fibroblastos que expresan MSLN (frente a controles de MSLN) dirigen la liberación de citocinas de las células T transducidas (ensayo LUMINEX de sobrenadante celular para IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF), proliferación de células T (por marcaje con CFSE) y supervivencia de células T (por tinción con anexina V). Puede evaluarse la influencia de CD80 y/o 4-1BBL en la supervivencia, proliferación y eficacia de las células T. Las células T pueden exponerse a estimulación repetida por células diana MSLN⁺ y determinar si la proliferación de células T y la respuesta a las citocinas se mantuvieron similares o disminuyeron con la estimulación repetida. Los constructos de CAR Mz, M28z, MBBz, M28z*4-1BBL y M28z-IL-12 pueden compararse juntos en condiciones estrictamente equivalentes. Los ensayos de citotoxicidad con múltiples razones E:D pueden realizarse usando ensayos de liberación de cromo. El análisis estadístico puede realizarse opcionalmente con ANNOVA de 2 vías, seguido por procedimientos de comparación múltiple por parejas, en el que los datos pueden expresarse como media $\pm$ EEM. Los subtipos de células T CD4 y CD8 (efectoras activadas, de memoria central, de memoria efectora) pueden identificarse para determinar qué condiciones favorecen el mantenimiento o la expansión del fenotipo de la memoria central.

En un ejemplo no limitativo, en dos o más ratones cada uno con y sin tumores de TNBC que expresan MSLN de la misma línea celular, células T transducidas (Mz/M28z/MBBz/M28z*4-1BBL) y no transducidas pueden inyectarse por vía sistémica mediante inyección en la vena de la cola. Antes de la administración, las células T pueden marcarse con CFSE, transducirse con luciferasa de *Gaussia* y cuantificarse para su emisión. A las 24 h y 7, 40 y 70 días, el tráfico de células T y la persistencia en el MET puede evaluarse mediante BLI para las células T y la citometría de del tumor recogido de ratones sacrificados (4 ratones en cada punto de tiempo), y puede confirmarse adicionalmente mediante análisis de IHC. Para determinar la influencia específica de la expresión de MSLN en el tráfico de células T, pueden inyectarse los ratones con un número igual de células tumorales que expresan MSLN en la almohadilla mamaria derecha y células tumorales negativas para MSLN en la almohadilla mamaria izquierda, y pueden administrarse células T por vía sistémica. Los ratones con TNBC positivo a obtención de imágenes pueden inyectarse con una mezcla 1:1 de células T no transducidas y dirigidas por vía sistémica. Las células T no transducidas pueden marcarse con luciferasa de Click Beetle, y las células T dirigidas pueden marcarse con luciferasa de *Gaussia* y seguir con BLI para caracterizar su farmacodinámica en relación con las células de TNBC MSLN⁺. La persistencia y proliferación de células T puede distinguir por el marcado con CFSE de las células T, determinado por citometría de flujo después de que se sacrifican los ratones.

En un ejemplo no limitativo, para estudiar la especificidad y la eficacia de las células T dirigidas, SMRP y ratones positivos a obtención de imágenes con TNBC metastásico (o bien enfermedad metastásica pleural o bien enfermedad metastásica sistémica) pueden dividirse en 4 grupos de 36 ratones cada uno. Los ratones pueden tratarse con células T de control administradas por vía sistémica (grupo 1) o por vía intrapleural (grupo 2) o con células T dirigidas a MSLN administradas por vía sistémica (grupo 3) o por vía intrapleural (grupo 4). Las células T de control pueden transducirse con vectores hrGFP. Pueden administrarse células T en dosis de 1 millón de células a 5 millones de células. La carga tumoral puede monitorizarse mediante BLI en serie y midiendo SMRP, además de la monitorización para determinar la pérdida de peso y la caquexia. Pueden sacrificarse tres ratones de cada grupo a los 7, 21, 40 y 70 días después de la administración de células T para el examen histológico y análisis de IHC. El tejido recogido puede analizarse mediante citometría de flujo para determinar la persistencia de las células T específicas y el fenotipo. Los parámetros de evaluación de la eficacia de la terapia con células T son la carga tumoral que puede evaluarse por el número y la distribución de los nódulos tumorales (en la cavidad pleural = peso medio de la pared torácica de la enfermedad/ratones tratados - peso medio de la pared torácica de los ratones control), número y carga de metástasis en ganglios linfáticos, niveles séricos de SMRP, carga tumoral micrometastásica en órganos sólidos tal como se detecta mediante citometría de flujo y supervivencia a largo plazo de los ratones. La mediana de supervivencia y las curvas de supervivencia de cada grupo de ratones pueden monitorizarse y medirse en un experimento paralelo de 12 ratones por grupo.

En determinadas realizaciones, una célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente (por ejemplo, célula T) expresa desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3, o desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3 números de copias de vectores/célula de un CAR específico de mesotelina dado a conocer actualmente. Por ejemplo, una célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente (por ejemplo, célula T) expresa aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, o aproximadamente 4 números de copias de vectores/célula del CAR específico de mesotelina. En una realización no limitativa, una célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente (por ejemplo, célula T) expresa desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4 números de copias de

vectores/célula de un CAR específico de mesotelina dado a conocer actualmente. En determinadas realizaciones, la citotoxicidad y la producción de citocinas de la célula inmunorreactiva (por ejemplo, célula T) son proporcionales al nivel de expresión del CAR específico de mesotelina en la célula. Por ejemplo, cuanto mayor es el nivel de expresión de CAR en una célula inmunorreactiva, mayor la citotoxicidad y producción de citocinas que presenta la célula inmunorreactiva. Una célula inmunorreactiva (por ejemplo, célula T) que tiene un alto nivel de expresión de CAR de mesotelina puede inducir producción o secreción de citocinas específica de antígenos y/o presentar citotoxicidad a un tejido o una célula que tiene una bajo nivel de expresión de mesotelina, por ejemplo, aproximadamente 2.000 o menos, aproximadamente 1.000 o menos, aproximadamente 900 o menos, aproximadamente 800 o menos, aproximadamente 700 o menos, aproximadamente 600 o menos, aproximadamente 500 o menos, aproximadamente 400 o menos, aproximadamente 300 o menos, aproximadamente 200 o menos, aproximadamente 100 o menos de sitios de unión a mesotelina/célula. Véanse, por ejemplo, los ejemplos 4 y 5. Adicional o alternativamente, la citotoxicidad y producción de citocinas de una célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente (por ejemplo, célula T) son proporcionales al nivel de expresión de mesotelina humana en un tejido diana o una célula diana. Por ejemplo, cuanto mayor es el nivel de expresión de mesotelina humana en la diana, mayor la citotoxicidad y producción de citocinas que presenta la célula inmunorreactiva. Véase, por ejemplo, el ejemplo 5.

En determinadas realizaciones, las células diana son células que expresan MSLN heterogéneas, que son una población de células que comprende células con baja expresión de MSLN y células con alta expresión de MSLN. La célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente puede presentar citotoxicidad y actividad antitumoral aumentadas a células con baja expresión de MSLN (por ejemplo, aproximadamente 2.000 o menos, aproximadamente 1.000 o menos, aproximadamente 900 o menos, aproximadamente 800 o menos, aproximadamente 700 o menos, aproximadamente 600 o menos, aproximadamente 500 o menos, aproximadamente 400 o menos, aproximadamente 300 o menos, aproximadamente 200 o menos, o aproximadamente 100 o menos sitios de unión a MSLN/célula) en presencia de células con alta expresión de MSLN. Véase, por ejemplo, el ejemplo 2. En determinadas realizaciones, incluso en presencia de células con alta expresión de MSLN, la célula inmunorreactiva no presenta citotoxicidad aumentada o destrucción no específicas de células negativas a MSLN. Por tanto, la célula inmunorreactiva puede presentar citotoxicidad y actividad antitumoral aumentadas a células con baja expresión de MSLN en presencia de células con alta expresión de MSLN mientras que retiene la seguridad para células negativas a MSLN.

En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva puede expresar una o más moléculas de adhesión, que pueden aumentar la avides del CAR específico de MSLN, especialmente cuando el CAR es un CAR de baja afinidad. Los ejemplos no limitativos de moléculas de adhesión incluyen CD2 y VLA-4. CD2 expresado en la célula inmunorreactiva puede unirse a CD58 expresado en una célula diana (por ejemplo, una célula cancerosa). VLA-4 expresado en la célula inmunorreactiva puede unirse a VCAM-1 en una célula diana (por ejemplo, una célula cancerosa).

La fuente no purificada de CTL puede ser cualquiera conocida en la técnica, tal como la médula ósea, una fuente de células hematopoyéticas fetales, de neonato o de adulto u otra, por ejemplo, hígado fetal, sangre periférica o sangre del cordón umbilical. Pueden emplearse diversas técnicas para separar las células. Por ejemplo, los métodos de selección negativa pueden eliminar inicialmente los no CTL. Los AcM son particularmente útiles para identificar marcadores asociados con linajes celulares particulares y/o fases de diferenciación para selecciones tanto positivas como negativas.

Una gran proporción de células diferenciadas terminalmente puede eliminarse inicialmente mediante una separación relativamente en bruto. Por ejemplo, las separaciones de perlas magnéticas pueden usarse inicialmente para retirar grandes cantidades de células irrelevantes. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 80%, habitualmente al menos el 70% de las células hematopoyéticas totales se eliminarán antes del aislamiento celular.

Los procedimientos para la separación incluyen, pero no se limitan a, centrifugación en gradiente de densidad; reposicionamiento; acoplamiento a partículas que modifican la densidad celular; separación magnética con perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos; cromatografía de afinidad; agentes citotóxicos unidos a o utilizados junto con un AcM, que incluyen, pero no se limitan a, complemento y citotoxinas; y cribado con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, una placa, un chip, elutriación o cualquier otra técnica conveniente.

Las técnicas para la separación y el análisis incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo, que puede tener diversos grados de sofisticación, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, canales de impedancia.

Las células pueden seleccionarse contra células muertas, empleando tintes asociados con células muertas tales como yoduro de propidio (PI). Preferiblemente, las células se recogen en un medio que comprende suero de ternero fetal (SBF) al 2% o de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,2% o cualquier otro medio isotónico adecuado, preferiblemente estéril.

IV. Vectores

La modificación genética de las células inmunorreactivas (por ejemplo, células T, células CTL, linfocitos citolíticos

naturales) puede lograrse transduciendo una composición celular sustancialmente homogénea con un constructo de ADN o ARN recombinante. En una realización, el vector es un vector retroviral (por ejemplo, gammaretroviral o lentiviral) se emplea para la introducción del constructo de ADN o ARN en el genoma de la célula huésped. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica para el CAR específico de mesotelina puede clonarse en un vector retroviral y la expresión puede dirigirse desde su promotor endógeno, desde la repetición terminal larga retroviral o desde un promotor interno alternativo.

También pueden usarse vectores no virales o ARN. Puede usarse integración cromosómica aleatoria o integración dirigida (por ejemplo, usando una nucleasa, nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN), nucleasas de dedo de zinc (ZFN) y/o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) o expresión transgénica (por ejemplo, usando un ARN natural o modificado químicamente).

Para la modificación genética inicial de las células para proporcionar células específicas de mesotelina, se emplea generalmente un vector retroviral para la transducción, sin embargo, puede usarse cualquier otro vector viral adecuado o sistema de administración no viral. Para la modificación genética posterior de las células para proporcionar células que comprenden un complejo presentador de antígeno que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, la transferencia génica retroviral (transducción) también demuestra ser eficaz. Las combinaciones de un vector retroviral y una línea de envasado apropiada también son adecuadas, en las que las proteínas de la cápside serán funcionales para infectar células humanas. Se conocen diversas líneas celulares productoras de virus anfitrión, incluyendo, pero sin limitarse a, PA12 (Miller, *et al.* (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller, *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); y CRIP (Danos, *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464). Las partículas no anfitrión también son adecuadas, por ejemplo, partículas pseudotipadas con envoltura de VSVG, RD114 o GALV y cualquier otra conocida en la técnica.

Los posibles métodos de transducción también incluyen el cultivo conjunto directo de las células con células productoras, por ejemplo, mediante el método de Bregni, *et al.* (1992) Blood 80:1418-1422, o cultivar con sobrenadante viral solo o reservas de vectores concentrados con o sin factores de crecimiento y policlones apropiados, por ejemplo, mediante el método de Xu, *et al.* (1994) Exp. Hemat. 22:223-230; y Hughes, *et al.* (1992) J. Clin. Invest. 89:1817.

Pueden usarse vectores virales transductores para expresar un ligando coestimulador (por ejemplo, 4-1BBL e IL-12) en una célula inmunorreactiva. Preferiblemente, el vector elegido presenta una alta eficiencia de infección y una integración y expresión estables (véase, por ejemplo, Cayouette *et al.*, Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido *et al.*, Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer *et al.*, Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini *et al.*, Science 272:263-267, 1996; y Miyoshi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997). Otros vectores virales que pueden usarse incluyen, por ejemplo, vectores virales adenovirales, lentivirales y adenoasociados, virus de la vaccinia, un virus del papiloma bovino o un virus del herpes, tal como el virus de Epstein-Barr (véanse también, por ejemplo, los vectores de Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis *et al.*, BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev *et al.*, Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta *et al.*, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller *et al.*, Biotechnology 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle *et al.*, Science 259:988-990, 1993; y Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995). Los vectores retrovirales están particularmente bien desarrollados y se han usado en ámbitos clínicos (Rosenberg *et al.*, N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson *et al.*, patente estadounidense n.º 5.399.346).

En un ejemplo no limitativo, un vector que codifica para un CAR dirigido a MSLN dado a conocer actualmente es un vector retroviral, por ejemplo, un vector retroviral SGF γ , que es un vector retroviral basado en leucemia murina de Moloney, tal como un vector retroviral SGF γ que codifica para M28z tal como se muestra en las figuras 24A y 26. La secuencia de nucleótidos del ADN del plásmido de SFG-ICAS9-P2A-M28z se expone en SEQ ID NO: 36, que se proporciona a continuación:

CATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCA
 GACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCTCCCGGGACAGAAA
 CAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGAT
 GAGTGTGGGTGACAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGG
 CATCATCCCAACCATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTGGATC
 CGGAGTCGACGGATTTGGTGATGTGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACAT
 CCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCT
 CCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCAT
 GGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGA
 CCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAATCTCTCTCACGGCTGTGAGGCCAGCCACCTGCAGTT
 CCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGG
 GACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAA
 AGACCATGGGTTTGAGGTGGCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGA
 TGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGGCCACACC
 CAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCAGGTTTGTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTC
 CTGGTACGTTGAGACCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCT
 GCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTT
 ccggaaaaaacttttctttaaacatcaGGATCTGGAGCAACAACTTCTCACTACTCAACAAGCAGG
 TGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCAATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCTGCT
 CCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGGTTTCAGCTTCAGGAGAGTGGCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGTGAGAC
 TCTCAGCTTGACTTGCACAGTTTCTGGAGGCAGTGTCTCCTCAGGCAGCTATTATTGGTCTTGGATTG
 GCAGCCCCCTGGGAAAGGCCCTGGAGTGGATTGGGTACATATATTACAGTGGCAGCACAAATTACAATCC
 ATCCCTGAAGTCTCGAGTAATATCAGTGTGGACACAAGCAAGAATCAGTTTTCACTCAAAGTGTCTTC
 TGTGACTGCTGCTGACACTGCTGTTTATTATTGTGTCAGGGAGGGGAAAAATGGGGCATTGTGATTTG
 GGGTCAGGGCACAATGGTGACAGTCAGCTCTGGAGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGAGGCAGTGGAGGTGG
 TGGGTACGCCATCAGATGACTCAGTCCCCcTCCAGTCTTTCTGCCTCAGTTGGGGATAGAGTGACCAT
 CACATGCAGAGCAAGTCAGAGCATATCATCCTATCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCC
 CAAATTGCTGATTTATGCAGCCTCAAGTCTCCAGAGTGGGGTGCCAAGCAGGTTCTCAGGCAGTGGCAG
 TGGGACAGATTTACATTGACAATCAGCTCCCTCCAACCTGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCA
 ATCCTACAGCACGCCCTGACTTTTGGAGGTGGCACAAGGTAGAGATCAAGAGGACTGCGGCCGCAAT
 TGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTTCCATGTGAAAGG
 GAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGG
 TGGAGTCTTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAG
 GAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACATGACTCCCGCGCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTAC
 CCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGACAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGA
 CGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA
 CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA
 GGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGG
 CGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTA
 CGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAACAGCCACTCGAGGATCCGGATTAGTCCAATTT
 GTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTGTACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATA
 GAGTACGAGCCATAGATAAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCC
 ACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGA
 ATAGAGAAGTTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTG
 GTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATA
 TCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCT
 CAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCCTTA
 TTTGAACTAACCAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAG

AGGCCACAACCCCTCAGCTCGGGGCGCCAGTCTCTCGATTGACTGAGTCGCCCGGGGTACCGGTGTATCCAA
 ATAAACCCCTCTTGAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTTGGGAGGGTCTCCCTCTGAGTGAT
 TGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACATGCGCAGCATGTATCAAAATTAATTTGGTTTTTTtCTTAAG
 TATTACATTAATAATGGCCATAGTACTTAAGGTACATTTGGCTTCCCTTGAAATAAACATGAGATATCTCAG
 AATGTGTCATAAAATATTCTCAATTTTAAGATAGTATCTCCATTGGCTTTCTACTTTTTCTTTTATTTTTT
 TTTGTCTCTGTCTTCCATTGT
 TTTTTTAAAGATCCTACACTATGATTTCAGCTAGACTATTAGCTACTCTGTAAACCCAGGGTGACCTTGA
 AGTCATGGGTAGCTGCTGTATTATGACCTTCCCACATCAAGATTAACAGTATAGCTATCATTTTTTGGT
 ATATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTG
 TGTATGGTTGTGTGTGATTGTGTGTATGTATGTTTGTGTGTGATTGTGTGTGTGTGATTGTGCATGTGT
 GTGTGTGTGATTGTGTTTTATGTGTATGATTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGTGTGTGTGTGTATATATTTATGGTAGTAGAGGCAACGCTCCGGCTCAGGTGTGAGTTGGTTTT
 GAGACAGAGCTTTTCACTTAGCTTGGAACTTCTGCGCTGCTTTTTACAACTGCTGACTGAGGAAACCC
 CTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
 CCCGCAACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTTATTTTC
 TCTTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCCGCATATGGTGCACTCTAGTACAATCTGCTCTGATGCCG
 CATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCGCAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGG
 CATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCCGTCATCAC
 CGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGG
 TTTCTTAGACGTGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTTAA
 TACATTTCAATATGTATTCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATCTCAATAATATGAAAAAGGA
 AGAGTATGAGTATTTCAACATTTTCGCTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGGCTTCTGTTT
 TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACA
 TCGAATCGGATCTCAACACGGGCTAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGA
 GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGCTATTATCCCGTATGACGCCGGGCAAGGACAACCTCGGT
 CGCGCATACACTATTCTAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAGGCTCAGGACGAGAAAGCATCTTACGAGT
 GCATGACAGTAAGAGAATTATGAGTGTCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTTC
 TGACAACGATCGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATAGGGGATCATGTAACCTCGCC
 TTGATCGTTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCGCTGAG
 CAATGGCAACACGTTGCGCAAACTATTAATCTGGCACTACTTACTTACTGCTCCCGGCAACAATATA
 TAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTA
 TTGCTGTAAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCGAGCACTGGGGCCAGATGGTA
 AGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGA
 TCGCTGAGATAGGTGCTCTACTGATTAAGCATTTGGTAAGTGTAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT
 AGATTGATTTTAAACCTTCAATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
 CCAAAATCCCTTAAAGTGAAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
 CTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAACTCTGCTGTGCAACAAAAAACACCGCTACACGCGGTGG
 TTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACGAGCGAGATAC
 CAATACTGTTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGCTCTGTAGCACCGCCCTACT
 ACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGG
 ACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACCGGGGGTTCTGTGCACGCCCCA
 GCTTGGGAGCGAAGGACTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
 CGAAGGAGGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGCAGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGAGGAG
 TTCCAGGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTTCGAT
 TTTTGTGATGCTGCTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAGAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCC
 TGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTCTGCTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTA
 TTACCGCTTTTGTGAGTGTGATACCGCTCGCCGACGCCAGCTGAGCGACGAGTCACTGAGTGAAGCG
 AGGAAGCGGTAAGAGCGCCCAATACGCAACACGCTCTCCCGCGCGTTGCGCGATTCTTAATGACAGCT
 GGCACGACAGGTTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTATGTGAGTTAGCTCACTC
 ATTAGGACCCCCAGGCTTTTACATTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAAC
 AATTTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTGGAGGTTTCTTAATACAT
 CCCAAACTCAAAATATATAAGCATTTGACTTGTCTTATGCCATAGCCCTAGGGCGGGGGAGTCAAGCCAGC
 TTTTTTtAACATTTAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGATGTTTTTATTTCATAAGGGTTTCAA
 TGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATAAAAAATAGATAAAGCTGGAATTT
 ACTTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCTTCTCAGTTGACAACATAAATGCGCTGCTGAGAAGCCGAT
 TTGCATCTGTGAGCTCAATTTTCCATATGCCAGTCATATTAATCTAGTCAATTAGTTGATTTTTTTA
 TTTTGTACATATACATGTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAAGTAACGCCATTTTG
 CAAGGCTATGGAATAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTTTCAGATCAAGGTGAGGAACAGATGGAACAGC
 TGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGTGTAAGCAGTTCTCTCCCGGCTGAGGGCCAAAGACAGATGG
 AACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGTTAAGCAGTTCTTCCCGGCTCAGGCGCCAGAAC
 AGATGGTCCCGAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGGC

CAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCG
CGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACACCCCTCACTCGGCGGCCAGTCTCCGATTGA
CTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTG
TTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTGAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTC
CGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCCGACCCACCCGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTAT
CTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTATGCGCTGCGTCCGTAAGTGTAGCTAAC
TAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGCAACCTGGGAGA
CGTCCAGGGACTTCGGGGGCGGTTTTTGTGGCCGACCTGAGTCTTAAATCCCGATCGTTTAGGACT
CTTTGGTGCACCCCTTAGAGGAGGATATGTGGTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAACAGTTCCC
GCCTCCGTCTGAATTTTGTCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCTTGTCTGCTGCAGCAT
CGTTCTGTGTTGTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGGCCCGGGCTAGCCTGT
TACCACTCCCTTAAGTTTACCTTAGGTCACTGGAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAAGTCGGT
AGATGTCAGAAGAGACGTTGGGTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCC
GCGAGACGGCACCTTAACCGAGACCTCATCACCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCGCA
TGGACACCCAGACAGGTCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCTCCCTGGGT
CAAGCCCTTTGTACACCTAAGCCTCCGCTCCTCTTCTCCATCCGCCCGTCTCTCCCTTTGAACC
TCCTCGTTCGACCCCGCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATG
GCCATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCGCCCTTGTAAACTTCCCTGACCCTGACATGACAAGAGT
TACTAACAGCCCTCTCTCCAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGACC
TCTGGCGGCAGCTACCAAGAACAAGTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTCGGCGACAC
AGTGTGGTCCGCCGACACAGACTAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAGGACCTTACACAGTCTGTGCT
GACCAACCCACCGCCCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGC
CGACCCCGGGGTGGACCATCTCTAGACTGC [SEQ ID NO: 36]

Un vector retroviral SGF γ que codifica para M28z puede construirse insertando dos fragmentos de ADN en un NotI/BglII de 6,7 kb de la estructura principal de SFG. La estructura principal codifica para lo siguiente: (1) el vector retroviral SGF γ completo excepto para una región que abarca el SA y 5'UTR del ARNm que codifica para la env. de Mo-MLV; (2) el CDS del dominio de señalización de CD28 humano fusionado al dominio de señalización de CD3 ζ humano.

El fragmento de ADN 1 puede ser un fragmento de BglII/BspEI de 1,5 kb derivado del constructo de plásmido SFG-iCAS9-41BBL-NY28z. Este fragmento codifica para una región que abarca el SA y 5'UTR del ARNm que codifica para la env. de Mo-MLV fusionado al CDS de iCASP9 que carece de ocho aminoácidos del extremo C-terminal y el codón de parada. El CDS de iCASP9 puede derivarse por la síntesis *de novo* de Blue Heron Bio.

El fragmento de ADN 2 puede ser un fragmento de BspEI/NotI de 0,89 kb derivado de un producto de PCR de 0,979 kb. Este fragmento codifica para el CDS C-terminal de iCASP9 (sin el codón de parada) fusionado con scFv de secuencia líder_m912 de GSG-P2A-CD8a. Este producto de PCR puede sintetizarse a partir de SFG-TK-2A-M28z como molde usando los siguientes cebadores:

(1.) Cebador izquierdo de iCASP9-2A:

gcgctccggaaaaaacttttcttaaaacatc aggatctggagcaacaaacttc [SEQ ID NO: 37]

(2.) Cebador derecho de CD28: ggtgtttccctttcacatgg [SEQ ID NO: 38].

La secuencia de aminoácidos de P2A se expone en SEQ ID NO: 39, que se proporciona a continuación:

ATNFSLLKQAGDVEENPGP [SEQ ID NO: 39]

La secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 se expone en SEQ ID NO: 40, que se proporciona a continuación:

GCAACAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC [SEQ ID NO: 40]

El molde de SFG-TK_2A_M28z puede derivarse usando la estructura principal de SFG-Hsvtk_P2A_P28z y la secuencia de scFv de secuencia líder_m912 de CD8a en SFG-M28z_ires_hrGFP mediante PCR de extensión solapada. La secuencia de scFv de secuencia líder_m912 de CD8a en SFG-M28z_ires_hrGFP puede derivarse mediante la síntesis *de novo* de Blue Heron Bio usando una tabla de codones de expresión optimizada.

SFG/TK_2A_P28z puede derivarse de SFG/TP28z.3 usando un ligamiento de 3 piezas

(1) un fragmento de BglII/ BssHII de 1462 pb derivado de SFG-TP28z.3 que codifica para una región del vector Mo-MLV que contiene el sitio aceptor de corte y empalme fusionado al gen HSV-TK;

(2) un fragmento de BssHII/NotI de 880 pb derivado de un producto de PCR que codifica para el extremo 3' del gen HSV-TK gene sin el ScFv del péptido señal_J591 del codón de parada_GSG_2A_CD8a ScFv; y

(3) un fragmento de NotI/BssHII de 6652 pb derivado de SFG-TP28z.3 que codifica para el resto de la cadena zeta de CD28 transmembrana del receptor de antígeno quimérico más el residuo de la estructura principal del vector retroviral.

El producto de PCR puede amplificarse usando un ADN de plásmido previamente construido que codifica para el GSG_P2A_CD28z como molde. Pueden utilizarse los siguientes cebadores:

(1) HSVTK_ligador_GSG_P2A directo:

GCGCGCGCGCACGTTTGGCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACGGATC

TGGAGCAACAACTTC [SEQ ID NO: 41];

y

(2) P28z R inverso: gggtttcccttcacatgg [SEQ ID NO: 42]

SFG-iC9-41BBL-NY28z puede generarse insertando dos fragmentos en una estructura principal de AgeI/NotI de 6,8 kb derivado de SFG-Hsvtk_2A_P28z: (1) un fragmento AgeI/SacII de 1,7 kb derivado de pUC(-mcs)-CBNI que codifica para el SD de Mo-MLV y 5'UTR del ARNm de env. fusionados al CDS completo de iCASP9 y el 4-1BBL N-terminal fusionado en marco con el péptido de escisión gsg_P2A; y (2) un fragmento de SacII/AgeI de 1,5 kb derivado de pUC(-mcs)-CBNII que codifica para el CDS de 4-1BBL C-terminal restante fusionado a través de otro péptido de escisión GSG_P2A a un scFv que selecciona como diana al antígeno NYESO-1.

Tanto pUC(-mcs)-CBNI como pUC(-mcs)-CBNII pueden obtenerse de Blue Heron Bio y los insertos generados por la síntesis del gen *de novo*.

También pueden emplearse enfoques no virales para la expresión de una proteína en la célula. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula administrando el ácido nucleico en presencia de lipofección (Feigner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono *et al.*, Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham *et al.*, Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger *et al.*, Methods in Enzymology 101:512, 1983), asialoorosomucoid-polylysine conjugation (Wu *et al.*, Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu *et al.*, Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989), o por microinyección en condiciones quirúrgicas (Wolff *et al.*, Science 247: 1465, 1990). Otros medios no virales para la transferencia génica incluyen la transfección *in vitro* usando fosfato de calcio, DEAE dextrano, electroporación y fusión de protoplastos. Los liposomas también pueden ser potencialmente beneficiosos para la administración de ADN a una célula. El trasplante de genes normales en los tejidos afectados de un sujeto también puede lograrse transfiriendo un ácido nucleico normal a un tipo de célula que puede cultivarse *ex vivo* (por ejemplo, una célula primaria autóloga o heteróloga o una progenie de la misma), después de lo cual la célula (o sus descendientes) se inyectan en un tejido diana o se inyectan por vía sistémica. Los receptores recombinantes también pueden derivarse u obtenerse usando transposasas o nucleasas dirigidas (por ejemplo, nucleasas de dedos de zinc, meganucleasas o nucleasas TALE). La expresión transitoria puede obtenerse por electroporación de ARN.

La expresión de ADNc para su uso en métodos de terapia con polinucleótidos puede dirigirse desde cualquier promotor adecuado (por ejemplo, el citomegalovirus humano (CMV), el virus del simio 40 (VS40) o los promotores de metalotioneína), y regulado por cualquier elemento regulador de mamífero o intrón apropiado (por ejemplo, la estructura de potenciador/promotor/intrón del factor de elongación 1 □). Por ejemplo, si se desea, los potenciadores conocidos por dirigir preferentemente la expresión génica en tipos celulares específicos pueden usarse para dirigir la expresión de un ácido nucleico. Los potenciadores usados pueden incluir, sin limitación, los que se caracterizan como potenciadores específicos de tejidos o células. De manera alternativa, si se usa un clon genómico como constructo terapéutico, la regulación puede mediar por las secuencias reguladoras relacionadas o, si se desea, por secuencias reguladoras derivadas de una fuente heteróloga, incluyendo cualquiera de los promotores o elementos reguladores descritos anteriormente.

Las células resultantes pueden hacerse crecer en condiciones similares a las de las células no modificadas, por lo que las células modificadas pueden expandirse y usarse para una variedad de propósitos.

V. Polipéptidos y análogos y polinucleótidos

También se incluyen en el contenido dado a conocer actualmente dominios extracelulares de unión a antígeno que se unen específicamente a la mesotelina humana (por ejemplo, un scFv, tal como un scFv derivado del anticuerpo m912, un Fab o un (Fab)₂), polipéptidos CD3ζ, CD8, CD28, 4-1BB, 4-1BBL, IL-12, Mz, M28z, MBBz o fragmentos de los mismos, y polinucleótidos que codifican para los mismos que se modifican de manera que mejoran su actividad antineoplásica cuando se expresan en una célula inmunorreactiva. El contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos para optimizar una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico produciendo una alteración en la secuencia. Tales alteraciones pueden comprender determinadas mutaciones, deleciones, inserciones o modificaciones postraduccionales. El contenido dado a conocer actualmente comprende además análogos de cualquier polipéptido natural del contenido dado a conocer actualmente. Los análogos pueden diferir de un polipéptido que se produce de manera natural del contenido dado a conocer actualmente por diferencias de

- secuencia de aminoácidos, por modificaciones postraduccionales o por ambos. Los análogos del contenido dado a conocer actualmente pueden presentar generalmente al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99% o más de identidad con todo o parte de una secuencia de aminoácidos que se produce de manera natural del contenido dado a conocer actualmente. La longitud de la comparación de secuencias es de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 o más residuos de aminoácidos. Nuevamente, en un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre e^{-3} y e^{-100} indicando una secuencia estrechamente relacionada. Las modificaciones comprenden derivatización química *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación o glicosilación; tales modificaciones pueden producirse durante la síntesis o el procesamiento de polipéptidos o después del tratamiento con enzimas modificadoras aisladas. Los análogos también pueden diferir de los polipéptidos que se producen de manera natural del contenido dado a conocer actualmente por alteraciones en la secuencia primaria. Estos incluyen variantes genéticas, tanto naturales como inducidas (por ejemplo, como resultado de mutagénesis aleatoria por irradiación o exposición al sulfato de etanometilo o por mutagénesis específica del sitio como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), CSH Press, 1989, o Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). También se incluyen péptidos, moléculas y análogos ciclados que contienen residuos distintos de los ácidos de L-amina, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos que no se producen de manera natural o sintéticos, por ejemplo, aminoácidos beta ($\square$) o gamma (γ).
- Además de los polipéptidos de longitud completa, el contenido dado a conocer actualmente también proporciona fragmentos de uno cualquiera de los polipéptidos o dominios peptídicos del contenido dado a conocer actualmente. Un fragmento puede tener al menos 5, 10, 13 ó 15 aminoácidos. En algunas realizaciones, un fragmento tiene al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos. En algunas realizaciones, un fragmento tiene al menos de 60 a 80, 100, 200, 300 o más aminoácidos contiguos. Los fragmentos del contenido dado a conocer actualmente pueden generarse mediante métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica o pueden ser el resultado del procesamiento normal de proteínas (por ejemplo, la eliminación de aminoácidos del polipéptido naciente que no son necesarios para la actividad biológica o la eliminación de aminoácidos por corte y empalme de ARNm alternativo o eventos de procesamiento de proteínas alternativos).
- Los análogos no proteicos tienen una estructura química diseñada para imitar la actividad funcional de una proteína de la invención. Tales análogos se administran según métodos del contenido dado a conocer actualmente. Tales análogos pueden exceder la actividad fisiológica del polipéptido original. Los métodos de diseño análogo se conocen bien en la técnica, y la síntesis de análogos puede llevarse a cabo según tales métodos modificando las estructuras químicas de manera que los análogos resultantes aumenten la actividad antineoplásica del polipéptido original cuando se expresa en una célula inmunorreactiva. Estas modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a, sustituir grupos R alternativos y variar el grado de saturación en átomos de carbono específicos de un polipéptido de referencia. Los análogos de proteínas pueden ser relativamente resistentes a la degradación *in vivo*, dando como resultado un efecto terapéutico más prolongado tras la administración. Los ensayos para medir la actividad funcional incluyen, pero no se limitan a, los descritos en los ejemplos a continuación.
- Según el contenido dado a conocer actualmente, los polinucleótidos que codifican para un dominio de unión a antígeno extracelular que se une específicamente a la mesotelina humana (por ejemplo, un scFv (por ejemplo, un scFv derivado del anticuerpo m912), un Fab o un (Fab)₂), CD3 ζ , CD8, CD28, 4-1BB, 4-1BBL, IL-12, M ζ , M28 ζ y MBB ζ pueden modificarse mediante optimización de codones. La optimización de codones puede alterar tanto las secuencias génicas que se producen de manera natural como las recombinantes para lograr los niveles más altos posibles de productividad en cualquier sistema de expresión dado. Los factores que se implican en diferentes fases de la expresión de proteínas incluyen la adaptabilidad del codón, la estructura del ARNm y varios elementos en cis en la transcripción y traducción. Cualquier método o tecnología de optimización de codones adecuado que sean conocidos por los expertos en la técnica se puede usar para modificar los polinucleótidos del contenido dado a conocer actualmente, incluyendo, pero sin limitarse a, OptimumGene™, optimización de Encor y Blue Heron.
- En determinadas realizaciones, el dominio de unión a antígeno extracelular de un CAR dado a conocer actualmente es un scFv derivado del anticuerpo m912. La optimización de codones del anticuerpo m912 se realiza en base a cuatro algoritmos diferentes (por ejemplo, algoritmos Blue Heron y Encore). Las secuencias de optimización de codones obtenidas de los cuatro algoritmos se combinan, y todas los GPC y BAM-H1 se eliminan para una clonación óptima. La secuencia de nucleótidos con codones optimizados es aproximadamente el 70% homóloga al scFv del m912 original. Para obtener una expresión eficiente en una célula inmunorreactiva (por ejemplo, células T primarias humanas), la secuencia de nucleótidos con codones optimizados se une a una secuencia líder de CD8 humana, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para la SEQ ID NO: 20. La secuencia líder de CD8 proporciona una escisión de señal óptima que precede a la cadena pesada ScFv (QVQL). La optimización de codones optimiza la expresión de CAR de mesotelina en una célula inmunorreactiva, por ejemplo, múltiples células T primarias donadoras humanas, con buena eficiencia de transducción. Múltiples números de copias de vectores de CAR en múltiples células T donadoras se someten a prueba para determinar la eficacia funcional, la especificidad y la sensibilidad frente a múltiples células hematológicas y de cánceres sólidos con expresión variable de mesotelina. El CAR de

mesotelina basado en m912 con codones optimizados con un número de copias de vectores de 1-4 (más específicamente, aproximadamente 3-4) proporciona una citotoxicidad altamente eficaz contra dianas con alta expresión de mesotelina, pero una reactividad mínima contra dianas con baja expresión de mesotelina, es decir, tejido normal, que es una característica clave lograda para la seguridad del vector sin comprometer la eficiencia. La ingeniería genética innovadora descrita anteriormente en la generación de un CAR de mesotelina específico que es reactivo contra las células cancerosas que expresan mesotelina alta mientras evita el tejido normal que expresa mesotelina baja es óptimo para su uso como vector clínico para la terapia contra el cáncer al tiempo que garantiza la seguridad.

VI. Administración

- Los CAR específicos de mesotelina y las células inmunorreactivas que expresan los mismos del contenido dado a conocer actualmente pueden proporcionarse por vía sistémica o directamente a un sujeto para tratar o prevenir una neoplasia, una infección por patógenos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias o rechazo de injertos. En una realización, los CAR específicos de MSLN y las células inmunorreactivas que expresan los mismos se inyectan directamente en un órgano de interés (por ejemplo, un órgano afectado por una neoplasia). Alternativamente, los CAR específicos de MSLN y las células inmunorreactivas que expresan los mismos se proporcionan indirectamente al órgano de interés, por ejemplo, mediante administración en el aparato circulatorio (por ejemplo, la vasculatura tumoral). Pueden proporcionarse agentes de expansión y diferenciación antes, durante o después de la administración de células y composiciones para aumentar la producción de células T *in vitro* o *in vivo*.
- Los CAR específicos de MSLN y las células inmunorreactivas que expresan los mismos del contenido dado a conocer actualmente pueden administrarse en cualquier vehículo fisiológicamente aceptable, normalmente por vía intravascular, aunque también pueden introducirse en el hueso u otro sitio conveniente en el que las células puedan encontrar un sitio apropiado para la regeneración y diferenciación (por ejemplo, timo). Habitualmente, se administrarán al menos 1×10^5 células, llegando eventualmente a 1×10^{10} o más. Una población celular que comprende células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de MSLN puede comprender una población purificada de células. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente el porcentaje de células inmunorreactivas en una población celular usando diversos métodos bien conocidos, tales como la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los intervalos de pureza en las poblaciones celulares que comprenden células inmunorreactivas modificadas por ingeniería que expresan un CAR específico de MSLN pueden ser de desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 55%, desde aproximadamente el 55% hasta aproximadamente el 60%, desde aproximadamente el 65% hasta aproximadamente el 70%, desde aproximadamente el 70% hasta aproximadamente el 75%, desde aproximadamente el 75% hasta aproximadamente el 80%, desde aproximadamente el 80% hasta aproximadamente el 85%; desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 90%, desde aproximadamente el 90% hasta aproximadamente el 95%, o desde aproximadamente el 95 hasta aproximadamente el 100%. Los expertos en la técnica pueden ajustar fácilmente las dosificaciones (por ejemplo, una disminución de la pureza puede requerir un aumento de la dosificación). Las células inmunorreactivas pueden introducirse por inyección, catéter, o similar. Si se desea, también pueden incluirse factores, incluyendo, pero sin limitarse a, interleucinas, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL 6, IL-11, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, así como las otras interleucinas, los factores estimulantes de colonias, como G-, M- y GM-CSF, interferones, por ejemplo, gamma-interferón.

- Las composiciones del contenido dado a conocer actualmente comprenden composiciones farmacéuticas que comprenden células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de MSLN y un portador farmacéuticamente aceptable. La administración puede ser autóloga o no autóloga. Por ejemplo, las células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de MSLN y las composiciones que comprenden las mismas pueden obtenerse de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto compatible diferente. Las células T derivadas de sangre periférica del contenido dado a conocer actualmente o su progenie (por ejemplo, derivado *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) puede administrarse a través de inyección localizada, incluyendo administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición farmacéutica del contenido dado a conocer actualmente (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de MSLN), se formulará generalmente en una forma inyectable de dosificación unitaria (disolución, suspensión, emulsión).

VII. Formulaciones

- Las células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de MSLN y las composiciones que comprenden las mismas del contenido dado a conocer actualmente pueden proporcionarse de manera conveniente como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, disoluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. De manera adicional, las composiciones líquidas son algo más convenientes de administrar, especialmente por inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, pueden formularse dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar periodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender portadores, que pueden ser un disolvente o medio dispersante que contiene, por

ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando las composiciones que comprenden células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de MSLN del contenido dado a conocer actualmente en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros componentes, según se desee. Tales composiciones pueden mezclarse con un portador, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa, o similar. Las composiciones también pueden liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes de tamponamiento del pH, aditivos gelificantes o mejoradores de la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos habituales, como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985, incorporado en el presente documento como referencia, puede consultarse para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación innecesaria.

Pueden añadirse diversos aditivos que mejoran la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de alum inorn y gelatina. Según la presente invención, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendría que ser compatible con las células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de MSLN del contenido dado a conocer actualmente.

Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el líquido lagrimal. La isotonicidad deseada de las composiciones del contenido dado a conocer actualmente puede lograrse usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio se prefiere particularmente para tampones que contienen iones de sodio.

Si se desea, la viscosidad de las composiciones puede mantenerse al nivel seleccionado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. La metilcelulosa puede usarse porque está disponible de forma fácil y económica y es fácil trabajar con ella. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero, y similares. La concentración del espesante puede depender del agente seleccionado. El punto importante es usar una cantidad que logre la viscosidad seleccionada. Obviamente, la elección de portadores adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y la naturaleza de la forma de dosificación particular, por ejemplo, la forma de dosificación líquida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una disolución, una suspensión, un gel u otra forma líquida, tal como una forma de liberación en el tiempo o una forma introducida en un líquido).

Los expertos en la técnica reconocerán que los componentes de las composiciones deben seleccionarse para que sean químicamente inertes y no afectarán la viabilidad o eficacia de las células inmunorreactivas tal como se describe en el contenido dado a conocer actualmente. Esto no presentará ningún problema para los expertos en principios químicos y farmacéuticos, o los problemas pueden evitarse fácilmente haciendo referencia a textos habituales o mediante experimentos simples (que no impliquen una experimentación innecesaria), a partir de esta divulgación y los documentos citados en el presente documento.

Una consideración relativa al uso terapéutico de las células inmunorreactivas del contenido dado a conocer actualmente es la cantidad de células necesarias para logran un efecto óptimo. La cantidad de células que va a administrarse variará para el sujeto que se trata. En determinadas realizaciones, desde aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^{10} , por ejemplo, desde aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^5 , desde aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^6 , desde aproximadamente 10^5 hasta aproximadamente 10^6 , desde aproximadamente 10^6 hasta aproximadamente 10^7 , desde aproximadamente 10^7 hasta aproximadamente 10^8 , desde aproximadamente 10^8 hasta aproximadamente 10^9 , desde aproximadamente 10^9 hasta aproximadamente 10^{10} , desde aproximadamente 10^5 hasta aproximadamente 10^9 , o desde aproximadamente 10^6 hasta aproximadamente 10^8 de las células inmunorreactivas dadas a conocer actualmente se administran a un sujeto. Pueden administrarse células más eficaces en números incluso más pequeños. En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente 1×10^4 , al menos aproximadamente 1×10^5 , desde aproximadamente 1×10^4 hasta aproximadamente 1×10^5 (por ejemplo, aproximadamente 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 ó 1×10^5), desde aproximadamente 1×10^5 hasta aproximadamente 1×10^6 (por ejemplo, 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 ó 1×10^6), o desde aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^7 (por ejemplo, 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 ó 1×10^7) de las células inmunorreactivas dadas a conocer actualmente se administran a un sujeto.

En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 2×10^8 , aproximadamente 3×10^8 , aproximadamente 4×10^8 , y aproximadamente 5×10^8 de células inmunorreactivas del contenido dado a conocer actualmente se administran a un sujeto humano. La determinación precisa de que se consideraría una dosis

eficaz puede basarse en factores individuales para cada sujeto, incluyendo su altura, edad, sexo, peso y estado del sujeto particular. Las dosificaciones pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica a partir de esta divulgación y el conocimiento en la técnica.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos, y/o portador opcionales en composiciones y que va a administrarse en métodos del contenido dado a conocer actualmente. Normalmente, cualquier aditivo (además de la(s) célula(s) y/o los agente(s) activo(s)) están presentes en una cantidad de desde aproximadamente el 0,001% hasta aproximadamente el 50% en peso) de disolución en solución salina tamponada con fosfato, y el principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como desde aproximadamente 0,0001% en peso hasta aproximadamente 5% en peso, desde aproximadamente 0,0001% en peso hasta aproximadamente 1% en peso, desde aproximadamente 0,0001% en peso hasta aproximadamente 0,05% en peso, desde aproximadamente 0,001% en peso hasta aproximadamente 20% en peso, desde aproximadamente 0,01% en peso hasta aproximadamente 10% en peso, o desde aproximadamente 0,05% en peso hasta aproximadamente 5% en peso. Para cualquier composición que va a administrarse a un animal o un ser humano, y para cualquier método de administración particular, debe determinarse la toxicidad, tal como determinando la dosis letal (DL) y DL50 en un modelo animal adecuado, por ejemplo, roedor tal como el ratón; y, la dosificación de la(s) composición/composiciones, la concentración de componentes en la misma y el momento de la administración de la(s) composición/composiciones, que desencadenan una respuesta adecuada. Tales determinaciones no requieren una experimentación innecesaria a partir del conocimiento del experto en la técnica, esta divulgación y los documentos citados en el presente documento. Y, el momento para las administraciones secuenciales puede determinarse sin experimentación indebida.

VIII. Métodos de tratamiento

Microentorno tumoral. Los tumores tienen un microentorno hostil a la respuesta inmunitaria del huésped que implica una serie de mecanismos por células malignas para protegerse del reconocimiento y la eliminación inmunitarios. Este "microentorno tumoral hostil" comprende una variedad de factores inmunosupresores, incluyendo células T CD4⁺ reguladoras infiltrantes (Treg), células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), macrófagos asociados a tumores (TAM), citocinas inmunosupresoras que incluyen IL-10 y TGF- β , y expresión de ligandos dirigidos a receptores inmunosupresores expresados por células T activadas (CTLA-4 y PD-1). Estos mecanismos de inmunosupresión desempeñan un papel en el mantenimiento de la tolerancia y la supresión de respuestas inmunitarias inapropiadas, sin embargo, dentro del microentorno tumoral, estos mecanismos impiden una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz. De manera colectiva, estos factores inmunosupresores pueden inducir una marcada anergia o apoptosis de las células T modificadas con CAR transferidas de manera adoptiva al encontrarse con las células tumorales diana.

Desafíos en inmunología tumoral. La inmunidad tumoral eficaz requiere el reconocimiento de los antígenos tumorales y la eliminación tumoral sin oposición por las células efectoras inmunitarias. Los antígenos tumorales deben contener epítopos peptídicos que son presentados por el tumor y pueden reconocerse por linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos. Los CTL cebados deben expandirse a un número suficiente y migrar a sitios tumorales, en los que maduran en células efectoras para realizar sus funciones, que se mejoran por células T auxiliares y se amortiguan por Treg y macrófagos inhibitorios.

Terapia dirigida con células T con linfocitos T modificados por ingeniería. La ingeniería de células T es una estrategia innovadora para resolver potencialmente muchas deficiencias previamente observadas de enfoques inmunoterapéuticos anteriores. Durante el año pasado, los investigadores informaron remisiones completas drásticas en recaídas^{10,11}, leucemia resistente al tratamiento químico y melanoma metastásico¹²⁻¹⁴, obtenido con células T autólogas de sangre periférica dirigidas a un antígeno definido (CD19 y NY-ESO-1, respectivamente).

Base teórica de un enfoque genético: la ingeniería celular puede usarse para redirigir células T hacia los antígenos tumorales y para mejorar la función de las células T. Un impulso para la modificación genética de células T es el potencial para mejorar la supervivencia y expansión de células T y para compensar la muerte, la anergia e inmunosupresión de las células T. El objetivo genético de las células T también puede refinarse para impedir la destrucción no deseada de tejidos normales.

Receptores de antígeno quimérico (CAR): las células T específicas de tumores pueden generarse mediante la transferencia de genes que codifican para los CAR¹⁵⁻²⁰. Los CAR de segunda generación comprenden un dominio de unión a antígeno tumoral fusionado a un dominio de señalización intracelular que puede activar células T y un dominio coestimulador diseñado para aumentar la potencia y persistencia de las células T²¹ (véase la figura 1). Por tanto, el diseño de CAR puede reconciliar el reconocimiento de antígeno con la transducción de señales, dos funciones que son llevadas fisiológicamente por dos complejos separados, el heterodímero TCR y el complejo CD3. El dominio extracelular de unión al antígeno de los CAR se deriva generalmente de un anticuerpo monoclonal murino (AcM) o de receptores o sus ligandos. Por tanto, el reconocimiento de antígeno no se restringe por MHC^{22,23} y, por tanto, es aplicable a cualquier paciente que exprese el antígeno diana, usando el mismo CAR. La unión al antígeno por los CAR desencadena la fosforilación de los motivos activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en el dominio intracelular, iniciando una cascada de señalización requerida para la inducción de la citólisis, la secreción de citocinas y la proliferación. Debido a que la restricción de MHC del reconocimiento de

antígenos se evita, la función de las células T dirigidas a CAR no se ve afectada por la regulación por disminución de HLA ni por defectos en la maquinaria de procesamiento de antígenos.

Requisitos de células T para la expansión y supervivencia: es necesaria la proliferación de células T específicas de tumores *ex vivo* y es posiblemente deseable *in vivo*. La proliferación de células T debe ir acompañada de supervivencia de células T para permitir la expansión y persistencia absoluta de las células T. Para proliferar en respuesta al antígeno, las células T deben recibir dos señales. Una es proporcionada por el reconocimiento de TCR de complejos péptido antigénico/MHC que se presentan en la superficie de células presentadoras de antígeno (APCS)¹⁹. La otra la proporciona un receptor coestimulador de células T, tal como los receptores de CD28 o 4-1BB. Mientras que la actividad citolítica de las células T no requiere coestimulación concomitante, existe la necesidad crítica de proporcionar señales coestimuladoras para mantener las funciones antitumorales de las células T transferidas de manera adoptiva, tal como se demostró anteriormente^{17,21,24-26}.

Monitorización inmunitaria: los linfocitos son “fármacos” multifuncionales que presentan de manera dinámica efectos de desarrollo después de la infusión. Tras el encuentro con el antígeno, las células T específicas de tumores activan y/o liberan una variedad de proteínas que pueden desencadenar la destrucción del tumor, la proliferación de células T y el reclutamiento o inmunomodulación de otras células inmunitarias. Por tanto, medir qué proteínas se secretan a partir de qué células, en qué cantidad y en qué punto de tiempo produce profundos conocimientos sobre por qué un paciente en particular está respondiendo o no y proporciona retroalimentación crítica para diseñar ensayos más eficaces. Estos sistemas de ensayo permitirán comparaciones directas y significativas de los enfoques clínicos y, por tanto, ayudarán a diseñar estrategias terapéuticas racionales de próxima generación.

Para el tratamiento, la cantidad administrada es una cantidad eficaz para producir el efecto deseado. Se puede proporcionar una cantidad eficaz en una o una serie de administraciones. Se puede proporcionar una cantidad eficaz en bolo o por perfusión continua.

Una “cantidad eficaz” (o “cantidad terapéuticamente eficaz”) es una cantidad suficiente para afectar a un resultado clínico beneficioso o deseado tras del tratamiento. Puede administrarse una cantidad eficaz a un sujeto en una o más dosis. En términos de tratamiento, una cantidad eficaz es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir o ralentizar la progresión de la enfermedad, o reducir de otra manera las consecuencias patológicas de la enfermedad. La cantidad eficaz se determina generalmente por el médico caso por caso y está dentro de la habilidad de un experto en la técnica. Normalmente, se tienen en cuenta varios factores cuando se determina una dosificación apropiada para lograr una cantidad eficaz. Estos factores incluyen la edad, el sexo y el peso del sujeto, el estado que va a tratarse, la gravedad del estado y la forma y concentración eficaz de las células inmunorreactivas administradas.

Para la inmunoterapia adoptiva con células T específicas de antígeno, normalmente se infunden dosis celulares en el intervalo de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} (por ejemplo, aproximadamente 10^9). Tras la administración de las células inmunorreactivas en el sujeto y la diferenciación posterior, se inducen las células inmunorreactivas que se dirigen específicamente contra un antígeno específico (por ejemplo, mesotelina humana). La “inducción” de células T puede incluir la inactivación de células T específicas de antígeno, tal como por deleción o anergia. La inactivación es particularmente útil para establecer o restablecer la tolerancia tal como en los trastornos autoinmunitarios. Las células inmunorreactivas del contenido dado a conocer actualmente pueden administrarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, administración pleural, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intranodal, administración intratumoral, administración intratecal, administración intrapleural, administración intraperitoneal y administración directa al timo. En una realización, las células inmunorreactivas y las composiciones que las comprenden se administran por vía pleural al sujeto que lo necesita.

El contenido dado a conocer actualmente proporciona diversos métodos de uso de las células inmunorreactivas (por ejemplo, células T) que expresan un CAR específico de mesotelina. Por ejemplo, el contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos de reducción de la carga tumoral en un sujeto. En un ejemplo no limitativo, el método de reducción de la carga tumoral comprende administrar una cantidad eficaz de la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto, induciendo así la muerte de células tumorales en el sujeto. La célula inmunorreactiva dada por conocer actualmente puede reducir el número de células tumorales, reducir el tamaño tumoral y/o erradicar el tumor en el sujeto. El tumor puede ser un tumor sólido. Los ejemplos no limitativos de tumor sólido incluyen mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, tumor pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, y colangiocarcinoma.

El contenido dado a conocer actualmente también proporciona métodos de aumento o alargamiento de la supervivencia de un sujeto que tiene neoplasia. En un ejemplo no limitativo, el método de aumento o alargamiento de la supervivencia de un sujeto que tiene neoplasia comprende administrar una cantidad eficaz de la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto, aumentando o alargando así la supervivencia del sujeto. El método puede reducir o erradicar la carga tumoral en el sujeto. De manera adicional, el contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos para aumentar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto. El contenido dado a conocer

actualmente proporciona además métodos para tratar o prevenir una neoplasia en un sujeto, que comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “neoplasia” se refiere a una enfermedad caracterizada por la proliferación patológica de una célula o tejido y su posterior migración a o invasión de otros tejidos u órganos. El crecimiento de la neoplasia es típicamente incontrolado y progresivo, y se produce en condiciones que no provocarían o provocarían el cese de la multiplicación de las células normales. Las neoplasias pueden afectar a una variedad de tipos de células, tejidos u órganos, incluyendo, pero sin limitarse a, un órgano seleccionado del grupo que consiste en vejiga, colon, hueso, cerebro, mama, cartílago, glía, esófago, trompa de Falopio, vesícula biliar, corazón, intestinos, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, tejido nervioso, ovarios, pleura, páncreas, próstata, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, tracto urogenital, uréter, uretra, útero y vagina, o un tipo de tejido o célula de los mismos. Las neoplasias incluyen cánceres, tales como sarcomas, carcinomas o plasmacitomas (tumor maligno de las células plasmáticas). En una realización, la neoplasia es un tumor sólido. La neoplasia puede ser un tumor primario o cáncer primario. Además, la neoplasia puede estar en estado metastásico.

Los cánceres cuyo crecimiento puede inhibirse usando las células inmunorreactivas del contenido dado a conocer actualmente comprenden cánceres que responden normalmente a la inmunoterapia. Los ejemplos no limitativos de cánceres para el tratamiento incluyen mesotelioma, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama metastásico, cáncer de mama triple negativo metastásico), cáncer de colon, tumor pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago y colangiocarcinoma. De manera adicional, el contenido dado a conocer actualmente comprende neoplasias malignas recurrentes o resistentes al tratamiento cuyo crecimiento puede inhibirse usando las células inmunorreactivas del contenido dado a conocer actualmente.

Los ejemplos de otras neoplasias o cánceres que pueden tratarse usando los métodos del contenido dado a conocer actualmente incluyen cáncer de hueso, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma (melanoma maligno cutáneo o intraocular), cáncer renal (p. ej., carcinoma de células claras), cáncer de garganta, cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente al tratamiento con hormonas), cánceres de sangre (por ejemplo, leucemias, linfomas y mielomas), cáncer uterino, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer testicular, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, leucemias (por ejemplo, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medioambiente, incluyendo los inducidos por amianto, incluyen la macroglobulinemia de Waldenstrom, la enfermedad de la cadena pesada y tumores sólidos como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

De manera adicional, el contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos de aumento de la producción de citocinas que activan el sistema inmunitario en respuesta a una célula cancerosa o un patógeno en un sujeto. En un ejemplo no limitativo, el método comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto. La citocina que activa el sistema inmunitario puede ser factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, factor regulador de interferón factor 7 (IRF7), y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, las células inmunorreactivas que incluyen un CAR específico de mesotelina del contenido dado a conocer actualmente aumentan la producción de GM-CSF, IFN- γ y/o TNF- α .

El contenido dado a conocer actualmente proporciona terapias que son particularmente útiles para tratar tumores sólidos (por ejemplo, mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, tumor pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, y colangiocarcinoma). Los tumores sólidos pueden ser

tumores primarios o tumores en estado metastásico. Determinados tumores sólidos son tumores que expresan MSLN heterogéneos, por ejemplo, cáncer de mama (por ejemplo, TNBC), cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer gástrico y mesotelioma pleural maligno (MPM). Las células heterogéneas que expresan MSLN (por ejemplo, células tumorales) son una población de células que comprende células con baja expresión de MSLN y células con alta expresión de MSLN. La célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente puede presentar una citotoxicidad y actividad antitumoral aumentadas para células con baja expresión de MSLN (por ejemplo, aproximadamente 2.000 o menos, aproximadamente 1.000 o menos, aproximadamente 900 o menos, aproximadamente 800 o menos, aproximadamente 700 o menos, aproximadamente 600 o menos, aproximadamente 500 o menos, aproximadamente 400 o menos, aproximadamente 300 o menos, aproximadamente 200 o menos, o aproximadamente 100 o menos sitios de unión a MSLN/célula), en presencia de células con alta expresión de MSLN. Véase, por ejemplo, el ejemplo 2. En determinadas realizaciones, incluso en presencia de células con alta expresión de MSLN, la célula inmunorreactiva no presenta citotoxicidad aumentada o destrucción no específica a células negativas para MSLN. Por tanto, la célula inmunorreactiva puede presentar citotoxicidad y actividad aumentada antitumoral frente a células con baja expresión de MSLN en presencia de células con alta expresión de MSLN, mientras que conserva la seguridad para las células negativas para MSLN.

Los sujetos humanos adecuados para la terapia comprenden de manera típica dos grupos de tratamiento que pueden distinguirse por criterios clínicos. Los sujetos con “enfermedad avanzada” o “alta carga tumoral” son los que tienen un tumor clínicamente medible. Un tumor clínicamente medible es uno que puede detectarse en función de la masa tumoral (por ejemplo, por palpación, tomografía axial computarizada, ecografía, mamografía o rayos X; los marcadores bioquímicos o histopatológicos positivos por sí solos no son suficientes para identificar a esta población). Una composición farmacéutica incorporada en el contenido dado a conocer actualmente se administra a estos sujetos para provocar una respuesta antitumoral, con el objetivo de paliar su estado. Idealmente, la reducción en la masa tumoral se produce como resultado, pero cualquier mejora clínica constituye un beneficio. La mejora clínica comprende un riesgo o tasa de progresión o reducción disminuido en las consecuencias patológicas del tumor.

Un segundo grupo de sujetos adecuados se conoce en la técnica como el “grupo adyuvante”. Estos son individuos que han tenido antecedentes de neoplasia, pero que han respondido a otro modo de terapia. La terapia previa puede haber incluido, pero no se restringe a, resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia tradicional. Como resultado, estos individuos no tienen tumor clínicamente medible. Sin embargo, se sospecha que están en riesgo de progresión de la enfermedad, ya sea cerca del sitio del tumor original o por metástasis. Este grupo puede subdividirse adicionalmente en individuos de alto y bajo riesgo. La subdivisión se realiza en función de las características observadas antes o después del tratamiento inicial. Estas características se conocen en las técnicas clínicas y se definen de manera adecuada para cada neoplasia diferente. Las características típicas de los subgrupos de alto riesgo son aquellas en las que el tumor ha invadido los tejidos vecinos, o que muestran afectación de los ganglios linfáticos.

Otro grupo tiene una predisposición genética a la neoplasia, pero aún no ha evidenciado signos clínicos de neoplasia. Por ejemplo, las mujeres que dan positivo para una mutación genética asociada con cáncer de mama, pero aún en edad fértil, pueden desear recibir uno o más de los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento en el tratamiento profilácticamente para prevenir la aparición de neoplasia hasta que sea adecuado para realizar cirugía preventiva.

Los sujetos pueden tener una forma avanzada de enfermedad, en cuyo caso el objetivo del tratamiento puede incluir mitigar o revertir la progresión de la enfermedad y/o mejorar los efectos secundarios. Los sujetos pueden tener antecedentes del estado, para el que ya han sido tratados, en cuyo caso el objetivo terapéutico típicamente incluirá normalmente una disminución o retraso en el riesgo de recaída.

Además, el contenido dado a conocer actualmente proporciona métodos para tratar sujetos con una infección por patógenos (por ejemplo, infección viral, infección bacteriana, infección fúngica, infección por parásitos o infección por protozoos). El contenido dado a conocer actualmente es particularmente útil para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto inmunodeprimido. Las infecciones virales a modo de ejemplo susceptibles de tratamiento usando un método de la invención incluyen, pero no se limitan a, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (EBV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) e infecciones por virus de la gripe. Por consiguiente, el contenido dado a conocer actualmente proporciona un método para tratar o prevenir una infección por patógenos en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de las células inmunorreactivas que expresan un CAR específico de mesotelina del contenido dado a conocer actualmente.

Según el contenido dado a conocer actualmente, los diversos métodos descritos anteriormente pueden comprender administrar al menos un agente inmunomodulador. Los ejemplos no limitativos de agentes inmunomoduladores incluyen agentes inmunoestimuladores, agentes de bloqueo inmunitario de punto de control, agentes de radioterapia y agentes de quimioterapia. En determinadas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente inmunoestimulador. Los ejemplos no limitativos de agentes inmunoestimuladores incluyen IL-12 y anticuerpos monoclonales coestimuladores agonistas. En una realización, el agente inmunoestimulador es IL-12. En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva del contenido dado a conocer actualmente en combinación con el anticuerpo anti-IL-12 se puede usar para tratar el cáncer de mama (BC), por ejemplo, el cáncer de mama

metastásico triple negativo (TNBC). Los ejemplos no limitativos de anticuerpos monoclonales coestimuladores agonistas incluyen anticuerpos anti-4-1BB, anticuerpos anti-OX40 y anticuerpos anti-ICOS. En una realización, el anticuerpo monoclonal coestimulador agonista es un anticuerpo anti-4-1BB.

Un aspecto esencial del contenido dado a conocer actualmente es no solo generar células T dirigidas a tumores (por ejemplo, específicas de mesotelina) para la terapia adoptiva sino mejorar la función de las células T mediante el diseño de receptores de antígeno mejorados y mediante la intervención en el microentorno del huésped mediante inmunomodulación usando IL-12. Entre todos los enfoques inmunoterapéuticos, la IL-12, una citocina multifuncional, ha sido considerada uno de los enfoques más prometedores para tratar el BC.⁵⁹⁻⁶¹ IL-12 se considera un regulador maestro de la inmunidad adaptativa mediada por células tipo 1, la ruta crítica implicada en las respuestas antitumorales⁶². IL-12 modula las respuestas antitumorales a diversos niveles, incluyendo la polarización de las células T CD4 hacia un fenotipo Th1⁶³, refuerzo de las funciones efectoras de células T y linfocitos citolíticos naturales⁶⁴, remodelando la respuesta inmunitaria innata⁶⁵ y regulando la angiogénesis tumoral⁶⁶. Las funciones inmunomoduladoras y antiangiogénicas de IL-12 han proporcionado la base teórica para usar esta citocina en combinación con la célula inmunorreactiva del contenido dado a conocer actualmente para tratar cánceres, por ejemplo, BC (por ejemplo, TNBC). Entre 148 ensayos clínicos que incluyen la administración de IL-12 a pacientes con cáncer (36 de los cuales se informaron recientemente), estudios exitosos de fase II con IL-12 intraperitoneal^{67,68} o subcutáneo^{69,70} han demostrado que la secreción paracrina de IL-12, generada por transferencia génica, puede inducir inmunidad contra el tumor localmente y en un sitio distante. Aunque varios estudios han documentado la eficacia anticancerígena de IL-12 en modelos preclínicos de cáncer de mama (BC)^{59,61,71}, la toxicidad significativa resultante de la administración de IL-12 humana recombinante observada en varios ensayos clínicos en cánceres avanzados impide su uso clínico. Para superar esta limitación, varios grupos han demostrado que la administración intratumoral de IL-12, usando vectores adenovirales, induce regresión tumoral y activación de células T en modelos preclínicos de BC^{72,73}. Más recientemente, Sabel *et al.* utilizaron microesferas de poli(ácido láctico) para liberar IL-12 en el tumor y encontraron que la respuesta antitumoral estaba mediada principalmente por linfocitos citolíticos naturales⁷⁴. Otros han usado células del estroma mesenquimatoso para administrar localmente IL-12 al BC de ratón⁷⁵. Un ensayo de fase I de paclitaxel y trastuzumab, en combinación con IL-12, en pacientes con tumores malignos que expresan HER2/neu mostró una sinergia impresionante entre IL-12 y trastuzumab para la estimulación de la secreción de citocinas de linfocitos citolíticos naturales⁷⁶. Por tanto, la IL-12 puede ser muy prometedora como agente anticancerígeno, y su uso como coestimulante en un enfoque de terapia de células T adoptivas está bien justificado.

En determinadas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente de bloqueo inmunitario de punto de control. Los ejemplos no limitativos de agentes de bloqueo inmunitario de punto de control incluyen anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-CTLA-4, anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7-H3 y anticuerpos anti-TIM3. En una realización, el agente de bloqueo inmunitario del punto de control es un anticuerpo anti-PD-L1. En determinadas realizaciones, la célula inmunorreactiva del contenido dado a conocer actualmente en combinación con el anticuerpo anti-PD-L1 puede usarse para tratar el cáncer de mama (BC), por ejemplo, TNBC.

El ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1/B7-H4/CD274) es una señal inhibitoria típicamente expresada en tejidos inflamados activamente, que sirve como un bucle de retroalimentación negativa para limitar la activación de las células T. La expresión de PD-L1 está ausente generalmente de los tejidos normales no inflamados (incluida la mama⁷⁷) y, en cambio, es más frecuente en los tejidos cancerosos, particularmente en aquellos con un infiltrado inflamatorio⁷⁸. Esta asociación con la inflamación probablemente se deba a la regulación por incremento de PD-L1 tras la exposición de las células tumorales a las citocinas secretadas por las células T generadas tras la activación de las células T. Este patrón de expresión se presenta en los BC, con el 50%-75% de los especímenes de BC que se tiñen positivamente para PD-L1⁷⁹⁻⁸¹ y con expresión fuertemente asociada con infiltrado linfocítico grave⁸⁰. Las células T infiltrantes de BC también expresaron PD-L1 en el 54% de los pacientes.⁸¹ Los BC también pueden expresar de forma innata PD-L1 secundaria a la señalización oncogénica. La activación de la ruta de PI(3)K da como resultado una regulación por incremento de la proteína PD-L1 en células de BC, y la activación de PI(3)K en tumores de pacientes se correlaciona significativamente con la expresión de PD-L1⁸². La expresión de PD-1 por las células T activadas une espacial y temporalmente el ligando con la expresión del receptor dentro del MET inmunosupresor. La expresión de PD-L1 en tejidos de BC la sugiere como una diana inmunoterapéutica para estos pacientes. La eficacia del bloqueo de PD-L1/PD-1 en múltiples modelos de cáncer preclínicos (incluyendo los de mama⁸³) allanó el camino para los ensayos de fase I que usan anticuerpos dirigidos a PD-L1 o PD-1 para pacientes con cánceres avanzados. Un estudio de fase I (usando un anticuerpo anti-PD-1) demostró eficacia solo en pacientes con positivos para PD-L1⁸⁴. Las células T modificadas por ingeniería ofrecen ventajas únicas para superar los puntos de control coinhibidores y la falta típica de coestimulación encontrada dentro del MET. Las células T que expresan CAR se diseñan precisamente para optimizar sus requisitos coestimuladores para apoyar la expansión, supervivencia y función de las células T.

En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente de radioterapia. El medio inmunológico localizado inducido por la radiación no solo puede proporcionar las condiciones previas para mejorar el injerto de células T dirigidas en el tumor (eliminando así la necesidad de regímenes de linforeducción sistémica), sino que las respuestas inmunológicas resultantes de una combinación de radioterapia y terapia con células T adoptiva también mejora la eficacia antitumoral abscópica. En tumores resistentes a la radiación, la señalización coestimuladora de 4-1BB en las células T-CAR puede superar la inmunoinhibición. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador

es un agente de quimioterapia, incluyendo, pero sin limitarse a, cisplatino. La secreción de quimiocinas y citocinas inducida por cisplatino puede promover respuestas de células T endógenas y dirigidas a la MSLN.

Los estudios han demostrado que los pacientes con adenocarcinoma de pulmón (LAC) y mesotelioma pleural maligno (MPM) que presentan altos niveles de linfocitos citotóxicos infiltrantes tumores (cTIL) y bajos niveles de células T reguladoras (Treg) tienen un mejor pronóstico y una supervivencia libre progresión más larga (Servais, *et al.*, Clin Cancer Res (1 de mayo de 2012); 18: 2478-2489; Kachala *et al.*, Clin Cancer Res (2013); 20 (4); 1020-8) Una terapia con células T adoptiva que usa un CAR dirigido a MSLN puede usarse para promover cTIL en LAC y MPM. Servais (2012) y Kachala (2013) informaron que la MSLN se sobreexpresa y promueve la agresividad en LAC y MPM, lo que justifica la elección del MSLN como diana para la terapia con células T-CAR. La mayor proporción de TIL tras terapia con cisplatino y radioterapia se asocia con resultados mejorados tanto en modelos de ratón como en pacientes (figuras 32, 33 y 34).

La inmunomodulación tumoral y abscópica inducida por la radioterapia y la terapia con cisplatino puede proporcionar el acondicionamiento previo requerido para un mejor injerto de las células T transferidas de manera adoptiva; las estrategias coestimuladoras de células T para aprovechar el tumor y la inmunomodulación estromal pueden mejorar la eficacia antitumoral de las células T tanto endógenas como transferidas de manera adoptiva.

De manera adicional, los diversos métodos descritos anteriormente de uso de las células inmunorreactivas (por ejemplo, células T) que expresan un CAR específico de mesotelina, por ejemplo, para tratar el cáncer en un sujeto, o para reducir la carga tumoral en un sujeto, pueden combinarse con modulación antigénica de células cancerosas. Las células inmunorreactivas (por ejemplo, células T) que expresan un CAR específico de mesotelina pueden seleccionar como diana y destruir la MSLN expresado en la membrana (denominada "MSLN de la membrana celular") de un tumor o una célula cancerosa pero no MSLN citoplasmática. Determinados tumores o cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón y mesotelioma) tienen bajo contenido de MSLN de la membrana celular, pero un alto contenido de MSLN citoplasmática. La modulación antigénica de células cancerosas puede aumentar la expresión de MSLN de la membrana celular en un tumor o una célula cancerosa, lo que puede hacer que el tumor o la célula cancerosa sean más susceptibles de ser seleccionados como diana por la célula inmunorreactiva que expresa CAR y, por tanto, más susceptibles a la destrucción por la célula inmunorreactiva. En una realización, la modulación antigénica de células cancerosas es radiación.

Pueden introducirse modificaciones adicionales en las células inmunorreactivas que expresan CAR específicas de mesotelina (por ejemplo, células T) para evitar o minimizar los riesgos de complicaciones inmunológicas (conocidas como "transformación de células T malignas"), por ejemplo, enfermedad injerto contra huésped (GvHD), o cuando los tejidos sanos expresan los mismos antígenos diana que las células tumorales, lo que conduce a resultados similares a GvHD. Una posible solución a este problema es modificar con ingeniería un gen suicida en las células T que expresan CAR. Los genes suicidas adecuados incluyen, pero no se limitan a, timidina quinasa del virus del herpes simple (hsv-tk), el gen suicida de Caspasa 9 inducible (iCasp-9) y un polipéptido del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano truncados (EGFRt). En una realización, el gen suicida es un polipéptido EGFRt. El polipéptido EGFRt puede permitir la eliminación de células T administrando un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab). EGFRt puede unirse de manera covalente al extremo terminal 3' del dominio intracelular del CAR específico de MSLN (por ejemplo, Mz, M28z, MBBz), tal como se muestra en la figura 25. El gen suicida puede incluirse dentro del vector que comprende ácidos nucleicos que codifican para los CAR específicos de mesotelina dados a conocer actualmente. De esta manera, la administración de un profármaco diseñado para activar el gen suicida (por ejemplo, un profármaco (por ejemplo, AP1903 que puede activar iCasp-9) durante la transformación de células T malignas (por ejemplo, GVHD) desencadena la apoptosis en las células T que expresan el CAR activado por el gen suicida.

Además, el contenido dado a conocer actualmente proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto. En un ejemplo no limitativo, el método comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto. En una realización, la célula inmunorreactiva es una célula inmunoinhibidora. En un ejemplo no limitativo, la célula inmunoinhibidora es una célula T reguladora. En una realización, la enfermedad inflamatoria es la pancreatitis. En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización específica, el sujeto es un receptor de un trasplante de órgano, por ejemplo, un receptor de un trasplante de páncreas.

Además, el contenido dado a conocer actualmente proporciona un método para prevenir el rechazo del injerto en un sujeto que recibe un trasplante de órgano. En un ejemplo no limitativo, el método comprende administrar la célula inmunorreactiva dada a conocer actualmente al sujeto. En una realización, la célula inmunorreactiva es una célula inmunoinhibidora. En un ejemplo no limitativo, la célula inmunoinhibidora es una célula T reguladora. En una realización, el sujeto es un ser humano. En una realización adicional, el sujeto es un receptor de un trasplante de páncreas.

Un CAR específico de mesotelina dado a conocer actualmente puede transducirse a una célula inmunoinhibidora, por ejemplo, una célula T reguladora. La célula inmunoinhibidora transducida puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene estados inflamatorios o una enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, el sitio inflamado o el sitio de la enfermedad inflamatoria tiene un alto nivel de expresión de mesotelina, que es reconocido por el MSLN-CAR dado a conocer actualmente. El estado inflamatorio puede ser extremo, por ejemplo,

pancreatitis grave. Además, la célula inmunoinhibidora transducida puede administrarse a un sujeto que recibe un trasplante de órgano.

Además, un CAR específico de MSLN dado a conocer actualmente, así como un segundo CAR dirigido a un antígeno MHC, se puede cotransducir en una célula inmunoinhibidora (por ejemplo, una célula T reguladora) de manera que la célula inmunoinhibidora pueda recogerse específicamente en el sitio del páncreas trasplantado. En un ejemplo, un sujeto de MHC de clase I recibe un trasplante de páncreas de un donante de MHC de clase II; las células T reguladoras del receptor se transducen con el CAR dado a conocer actualmente específico de MSLN y un segundo CAR dirigido a un antígeno MHC de clase II, y por tanto, las células T reguladoras transducidas del receptor se acumulan/agrupan en el sitio del páncreas trasplantado y evitan el rechazo de injertos u órganos.

IX. Kits

El contenido dado a conocer actualmente proporciona kits para el tratamiento o la prevención de una neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmunitario o trasplante alogénico. En una realización, el kit comprende una composición terapéutica o profiláctica que contiene una cantidad eficaz de una célula inmunorreactiva que comprende un CAR específico de mesotelina en una forma de dosificación unitaria. En realizaciones particulares, las células comprenden además un ligando coestimulador. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una vacuna terapéutica o profiláctica; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, frascos, viales, tubos, sacos, bolsas, envases tipo blíster u otras formas de recipientes adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden fabricarse de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para contener medicamentos.

Si se desea, la célula inmunorreactiva se proporciona junto con instrucciones para administrar la célula a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmunitario o trasplante alogénico. Las instrucciones incluirán generalmente información sobre el uso de la composición para el tratamiento o prevención de neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmunitario o trasplante alogénico. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente terapéutico; pauta posológica y administración para el tratamiento o prevención de una neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmunitario o trasplante alogénico o síntomas de los mismos; precauciones; advertencias; contraindicaciones; información de sobredosis; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente en el recipiente (cuando esté presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja, folleto, tarjeta o carpeta separada suministrada en o con el recipiente.

Ejemplos

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de la biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del alcance del experto en la técnica. Tales técnicas se explican con detalle en la bibliografía, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, pueden considerarse al realizar y practicar la invención. Se comentarán técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares en las secciones que siguen.

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación completa y una descripción de cómo realizar y usar el ensayo, los métodos terapéuticos y de examen de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Ejemplo 1 - Ejemplo de trabajo

1. INTRODUCCIÓN

La terapia de células T dirigida a antígeno de cáncer que usa receptores de antígeno quimérico (CAR) ha tenido un éxito clínico reciente en el tratamiento de tumores malignos hematológicos. La traducción de la terapia con células T-CAR a tumores sólidos plantea varios obstáculos que deben superarse para lograr un beneficio clínico. Los tumores sólidos están restringidos dentro de compartimentos anatómicos que impiden el tráfico eficiente de células T, normalmente carecen de la expresión de ligandos coestimuladores y expresan reguladores negativos de la función de las células T. Por tanto, la eliminación de tumores sólidos se basa en la infiltración exitosa de células T capaces de superar la inmunosupresión mediada por tumores.

La modificación por ingeniería que activa la señalización coestimuladora en receptores quiméricos específicos de antígeno puede contrarrestar el microentorno tumoral inmunosupresor para garantizar la proliferación y supervivencia de las células T. La capacidad de la señalización coestimuladora para mejorar la eficacia antitumoral se atribuye a un esfuerzo concertado entre subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺. Tradicionalmente, se cree que las células T CD8⁺ desempeñan el papel principal en la eliminación de las células cancerosas mientras que las

células T CD4⁺ proporcionan las citocinas cooperadoras necesarias para la formación de efectores CD8⁺ y la prevención de la reducción de células T CD8⁺. Más recientemente, la apreciación de que las células T CD4⁺ pueden mediar por sí mismas una potente eficacia antitumoral destaca un papel evolutivo para este subconjunto en la inmunoterapia tumoral. Los receptores de antígeno quimérico pueden ser especialmente adecuados para el reclutamiento eficaz de las células T CD4⁺ en todos los aspectos de la respuesta antitumoral. Las células T-CAR reconocen el antígeno tumoral de la superficie celular, sorteando la necesidad de expresión de CMH de clase II que falta en la mayoría de los tumores. Además, su dominio de reconocimiento de antígeno derivado de anticuerpos proporciona la alta afinidad de unión necesaria para la lisis mediada por células T CD4⁺.

Para fomentar el suministro eficiente de células T al tumor en un modelo ortotópico de mesotelioma pleural, las células T se administraron directamente en la cavidad pleural. Se planteó la hipótesis de que células T-CAR CD4⁺ administradas por vía pleural podrían lisar directamente el tumor y, junto con una mayor capacidad proliferativa conferida por la coestimulación de CD28, deberían mediar por sí mismas todas las funciones necesarias para la eliminación tumoral *in vivo*. Este ejemplo demuestra la eficiente lisis de células tumorales mediada por células T-CAR CD4⁺ de igual magnitud a la de CD8⁺ y una capacidad única de las células T-CAR CD4⁺ para secretar IL-2 y expandirse tras estimulaciones de antígeno *in vitro* repetidas. Las células T CD4⁺ administradas por vía pleural dirigidas genéticamente a mesotelina experimentan una proliferación robusta y la única transferencia de estas células da como resultado el rechazo de tumor pleural grande establecido. Además, las células T-CAR CD4⁺ migran fuera de la cavidad pleural y establecen inmunidad tumoral a largo plazo, tal como se demuestra por su capacidad para generar una respuesta a una reexposición al tumor extrapleural. En total, estudios tanto *in vitro* como *in vivo* respaldan el uso de la administración regional de células T-CAR para superar los obstáculos que plantean los tumores sólidos. Este ejemplo demuestra que la generación de células T CD4⁺ multifuncionales capaces de ayudar a las células T y la citotoxicidad proporcionan una ventaja particular al uso de la terapia con células T-CAR⁺ para el tratamiento de tumores sólidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se obtuvieron MSTO-211H (mesotelioma pleural humano) y EL4 (timoma murino) de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC. Se transdujeron células MSTO-211H de manera retroviral para expresar la proteína de fusión de proteína fluorescente verde/luciferasa de luciérnaga (MSTO GFP-*fluc*+) para facilitar la obtención de imágenes bioluminiscentes *in vivo* no invasiva. Estas células se transdujeron luego con la variante 1 de MSLN humana (aislada de una línea celular de cáncer de ovario humano (OVCAR-3)) subclonada en un vector retroviral SFG para generar MSTO MSLN⁺ GFP-*fluc*⁺.

Construcción de vectores gammaretrovirales y producción viral

Para generar receptores de antígeno quimérico específicos de mesotelina, se modificó por ingeniería una proteína de fusión que codifica para un scFv completamente humano, m912, ligado a un péptido líder de CD8 humano en su extremo N-terminal. Usando vectores gammaretrovirales como constructos de estructura principal, se intercambió este scFv para generar constructos específicos de mesotelina de primera generación (SFG-Mz) y segunda generación (SFG-M28z) mediante clonación direccional usando un sitio NcoI ubicado en 5' del scFv y un sitio NotI ubicado en 3' del scFv. Se insertó un sitio de entrada al ribosoma interno para facilitar la expresión bicistónica de CAR con el gen indicador de la proteína fluorescente verde recombinante humanizada (hrGFP). Se transfectaron luego SFG-Mz, SFG-M28z y SFG-P28z en líneas celulares de empaquetamiento 293T H29 y se usó este sobrenadante viral para transducir y generar líneas celulares 293T RD114 estables.

Aislamiento de células T, transferencia génica y aislamiento de CD4/CD8

Se aislaron leucocitos de sangre periférica de la sangre de donantes voluntarios sanos con un protocolo sometido a prueba por la junta de revisión institucional. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica activadas por PHA (PBMC) mediante centrifugación de baja densidad en Lymphoprep (Accurate Chemical & Scientific Corporation, NY). Dos días después del aislamiento, se transdujeron las PBMC con sobrenadante producido por 293T que contenía los vectores Mz, M28z o P28z durante 1 hora en placas recubiertas con retronectina 15 µg/ml (Takara Biomedical, Otsu, Japón) diariamente durante 2 días. Después de permitir 3 días para la expresión del vector, se mantuvieron las PBMC transducidas en 20 unidades/ml de IL-2. Se determinaron las eficiencias de transducción mediante citometría de flujo.

Se obtuvieron poblaciones puras de células T CD4 y CD8 a través de protocolos de selección negativa usando kits de aislamiento de células T CD4 y CD8 humanas Dynabeads® Untouched™, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, CA). Las células aisladas o bien se usaron inmediatamente en experimentos o bien se cultivaron en RPMI 1640 complementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 100 µg/ml. Para experimentos *in vivo*, los medios también se complementaron con 20 unidades/ml de IL-2.

Ensayos de citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad de las células T transducidas con un receptor de antígeno quimérico o control de vector

mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr convencional. En placas de fondo redondo de 96 pocillos, se diluyeron en serie 1×10^6 células T totales en 200 μl de RPMI con FCS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$, 1:2 en 100 μl de medio. Se incubaron las células diana con 100 μCi de ^{51}Cr por 1×10^6 células durante 2 horas y resuspendidas a una concentración final de 5×10^3 células/100 μl . Después de tres lavados con medios, se añadieron 100 μl de las células diana a las células T y se incubaron durante de 4 a 24 horas en un incubador humidificado con el 5% de CO_2 a 37°C . Para los experimentos que usan células CD4 estimuladas con MSLN, las dianas y los efectores de CD4 se incubaron en un volumen total de 100 μl durante cuatro horas y se añadieron al ensayo de citotoxicidad tal como se describió anteriormente con los efectores y las dianas en suspensión en 100 μl para un volumen total de 200 μl . En experimentos que añaden IL-2 exógena, se incubaron las células en un medio final con una concentración final de 10 - 40 unidades/ml. Se recogieron los sobrenadantes, se sembraron en placas Lumina de 96 pocillos (PerkinElmer, CA) y se midieron en un contador PerkinElmer TopCount (PerkinElmer, CA). Se evaluó la liberación espontánea de ^{51}Cr en células diana incubadas con medio sólo y se determinó la liberación máxima de ^{51}Cr con células diana incubadas en 100 μl de Triton-X 100 al 0,2%. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera: [(liberación experimental en cpm - liberación espontánea en cpm)/(liberación máxima en cpm - liberación espontánea en cpm)] $\times 100$. Se notifican los datos como la media de las mediciones por triplicado $\pm$ E.E.M. y se analizaron con Microsoft Excel (Microsoft Corp., WA) o GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA).

Aislamiento de células T, transferencia génica y aislamiento de CD4/CD8

Se aislaron linfocitos T primarios humanos de la sangre de donantes voluntarios sanos con un protocolo sometido a prueba por la junta de revisión institucional. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas por PHA mediante centrifugación de baja densidad en Lymphoprep (Accurate Chemical & Scientific Corporation, NY). Dos días después del aislamiento, se transdujeron las PBMC usando vectores retrovirales que codifican para M28zG, M2zG o proteína fluorescente verde recombinante humana (hrGFP) en placas de cultivo no tisular de 6 pocillos (Falcon, Becton Dickinson, NJ) recubiertas con retronectina 15 $\mu\text{g/ml}$ (Takara Biomedical, Otsu, Japón) según las instrucciones del fabricante, con sobrenadantes virales diariamente durante 2 días mediante espinoculación a 3000 rpm a 24°C durante 1 hora. Se mantuvieron las PBMC transducidas en RPMI-1640 complementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y 20 unidades/ml de IL-2. Se obtuvieron poblaciones puras de células T CD4 y CD8 a través de protocolos de selección negativa usando kits de aislamiento de células T CD4 y CD8 humanas Dynabeads® Untouched™, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, CA). Las células aisladas o bien se usaron inmediatamente en experimentos o bien se cultivaron en RPMI 1640 complementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$. Para experimentos *in vivo*, los medios también se complementaron con 20 unidades/ml de IL-2.

Modelo animal de mesotelioma pleural ortotópico y terapia adoptiva con células T

Para desarrollar el modelo de ratón ortotópico de mesotelioma pleural, se utilizaron ratones NOD/SCID gamma hembra (Taconic, NY) a las 6-10 semanas de edad. Se realizaron todos los procedimientos con protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y oxígeno inhalados y se les administró bupivacaína para la analgesia. Se realizó la inyección intrapleural directa de 1×10^5 - 1×10^6 células tumorales en 200 μl de medio libre de suero a través de una incisión en la parte derecha del tórax para establecer tumores de MPM ortotópicos tal como se describió previamente^{35,37,39,40}. Se transfirieron de manera adoptiva 3×10^4 - 3×10^6 células T transducidas a ratones portadores de tumor con una inyección de 200 μl de medio libre de suero en la cavidad torácica de ratones mediante inyección pleural directa o de manera sistémica mediante inyección en la vena de la cola. Para los experimentos con la administración de IL-2 exógena, a los ratones tratados se les administraron tres dosis intraperitoneales de 100.000 unidades de IL-2 diariamente a partir del día siguiente a la administración de células T transferidas de manera adoptiva.

Ensayos de detección de citocinas

Se realizaron ensayos de liberación de citocinas mediante el cocultivo de 5×10^5 - 5×10^3 células T transducidas con M28zG, M2zG o vector de control con 5×10^3 células diana en 200 μl de medio en placas de fondo redondo de 96 pocillos como triplicados. Después de 6-24 horas de cocultivo, se recogieron los sobrenadantes. Se determinaron los niveles de citocinas usando kits de detección de citocinas humanas con perlas multiplex (EMD Millipore Corp., MA) para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, MIP-1, MCP-1, RANTES, GM-CSF, TNF- α e IFN- γ en un sistema Luminex IS100. Los valores representan la media de los pocillos por triplicado y las barras de error representan el error estándar de medición (E.E.M.). Se analizaron los datos resultantes con el software IS 2.3 (Luminex Corp, TX), Microsoft Excel (Microsoft Corp., WA) y GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA).

Ensayos de proliferación de células T

Se estimularon 1×10^6 - 3×10^6 células T transducidas con M28zG, M2zG o hrGFP sobre células MSTO-211H irradiadas con o sin expresión de MSLN que se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 - 3×10^5 células/3 ml/pocillo. Se complementaron medios RPMI-1640 nuevos con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y 20-40 unidades/ml de IL-2. Se contaron las células cada 7 días y luego se superpusieron sobre células MSTO-211H irradiadas con o sin expresión de MSLN. Se representó

gráficamente el número de células frente al tiempo para cada grupo de células T y se determinaron los fenotipos mediante citometría de flujo.

Histología e inmunotinción

Se realizó la evaluación histopatológica de los tumores tras tinción con hematoxilina y eosina de muestras de tejido fijadas con paraformaldehído al 4%, incrustadas en parafina. Para la angiogénesis, se incubó el anticuerpo monoclonal de rata CD34 (5 µg/ml, eBioscience) durante 7 horas, seguido de 16 minutos con IgG de conejo anti-rata biotinilada (1:200) (Vector Labs, n.º de cat. BA-4000). Se usó IgG2a de rata (5 µg/ml) como control negativo de isotipo apropiado. Para la linfangiogénesis, se incubó el anticuerpo policlonal de cabra LYVE-1 (1 µg/ml; R&D Systems) durante 3 horas, seguido de 60 minutos con IgG de conejo anti-cabra biotinilada (kit ABC de Vector labs). Se establecieron los protocolos para la detección mediante inmunofluorescencia usando tiramida-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) o tiramida-Alexa Fluor 568 (Invitrogen) para CD34 y LYVE-1, respectivamente, y se realizaron en el Centro de Citología Molecular MSKCC usando un procesador automático Discovery XT (Ventana Medical Systems). La inmunohistoquímica para MSLN humana se realizó con una IgG de ratón anti-MSLN humana (1:100, Vector Labs, CA) usando la plataforma Ventana.

Obtención de imágenes cuantitativas y de bioluminiscencia de células T

Se realizó BLI *in vivo* en ratones que portaban tumor usando una única dosis intraperitoneal de 150 mg/kg de D-luciferina. Se obtuvieron imágenes de los ratones con el sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS 100 (Caliper Life Sciences, MA), 20 minutos tras la inyección de D-luciferina. Se adquirieron imágenes durante 5-30 segundos dependiendo de la intensidad de señal. Se analizaron los datos de BLI usando el software Living Image 2.60 y se notificó la señal de BLI como flujo total (fotones/s). Entonces se determinó el flujo de BLI (fotones/s) como el promedio de imágenes ventrales y dorsales con Microsoft Excel (Microsoft Corp., WA) y se analizó con GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA).

Se transfirieron manera adoptiva células T transducidas con M28zG y un gen indicador de luciferasa de luciérnaga mejorado a ratones mediante una única inyección intrapleural. Después de la transferencia, se obtuvieron imágenes de las células T con una única dosis intraperitoneal una única intravenosa de 150 mg/kg de D-luciferina y se obtuvieron imágenes durante 120 segundos, 20 minutos después de la inyección con un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS 100.

3. RESULTADOS

La coestimulación de CD28 dirigido a mesotelina potencia la función de las células T-CAR

Para generar células T reactivas a mesotelioma, se transdujeron células T humanas de sangre periférica de manera retroviral con receptores de antígeno quimérico (CAR) específicos de mesotelina. El reconocimiento de antígeno específico de mesotelina fue proporcionado lo proporcionó el scFv m912 fusionado a dominios de señalización de células T en sentido de 3' proporcionando o bien señalización de CD3z sola (Mz) o bien en tándem con señalización coestimuladora de CD28 (M28z) (figura 2A). La eficacia de la transducción de Mz y M28z se monitorizó a través de un transgén indicador de GFP ligado a la expresión de CAR mediante un elemento IRES. La señal de GFP estaba altamente correlacionada con la unión de la proteína L al scFv humano del CAR, lo que demuestra su fiabilidad como indicador. Se incluyó un control negativo que confiere especificidad a un antígeno irrelevante en todos los experimentos. Ambos subconjuntos CD4⁺ y CD8⁺ de células T humanas primarias se transdujeron eficientemente con receptores quiméricos a frecuencias equivalentes del 60-70% para los experimentos (figura 2B).

Para evaluar las funciones efectoras específicas de mesotelina de las células T transducidas con CAR Mz y M28z, se investigaron las respuestas de células T *in vitro* en tres ensayos convencionales. Como línea celular diana, se usó la línea celular de cáncer de mesotelioma MSTO-211H (que carece de la expresión de ligandos coestimuladores CD80/86 endógenos) transducida para sobreexpresar mesotelina (MSTO MSLN⁺). En un ensayo de liberación de cromo para medir la citotoxicidad, las células T-CAR Mz y M28z demostraron una lisis específica de mesotelina equivalente después de 18 horas de cocultivo con células tumorales MSTO MSLN⁺ (figura 2C). La observación de una lisis igual al comparar receptores de 1ª y 2ª generación reproducen los datos disponibles para otros receptores quiméricos.

Se observaron normalmente los efectos beneficiosos de la coestimulación al medir la proliferación y secreción de citocinas, confirmando los hallazgos en el sistema modelo. Las células T-CAR M28z secretan una cantidad aproximadamente dos veces mayor de GM-CSF, IFN-γ y TNF-α en comparación con las células T Mz. La secreción de IL-2, una citocina crucial para la supervivencia y proliferación de células T, la proporcionó de manera única el receptor M28z (figura 2D). Las células T transducidas con un receptor de control negativo y las células específicas de mesotelina estimuladas por células tumorales negativas para mesotelina no demostraron citotoxicidad ni secretaron citocinas, lo que demuestra la necesidad de especificidad de antígeno para todas las funciones efectoras antitumorales.

Evaluar si la coestimulación de CD28 proporcionada *in cis* con respecto al reconocimiento de antígeno puede proporcionar la acumulación de células T en ausencia de expresión de ligando coestimulador de células tumorales,

se cuantificó la expansión de células T-CAR Mz y M28z tras la estimulación de antígeno repetida con células tumorales MSTO MSLN⁺. En presencia de IL-2 exógena, se expandieron las células T transducidas con receptores específicos de mesotelina, logrando las células coestimuladas con CD28 una expansión de 180 veces después de cuatro semanas en cultivo con estimulación de antígeno semanal. Esta respuesta proliferativa robusta fue 3 veces mayor que la lograda por las células T-CAR Mz (figura 2E, parte izquierda). Además, en ausencia de IL-2 exógena, un sistema modelo que proporciona una prueba más vigorosa de la capacidad de las células T para sobrevivir y proliferar, sólo las células T-CAR M28z pudieron acumularse. Las células T coestimuladas fueron capaces de sobrevivir y proliferar tras dos estimulaciones de antígeno sucesivas antes de experimentar un descenso inducido por la muerte celular en el número de células T observado tras la tercera estimulación (figura 2E, parte derecha). Las células T-CAR Mz y M28z se enriquecieron para la positividad de GFP tras una estimulación sucesiva y alcanzaron un fenotipo de células T negativo para L-selectina diferenciado/efector tras la estimulación sucesiva (figura 2F).

Las células T transducidas con M28z administradas por vía pleural erradican el tumor de pleura

Para investigar la potencia de las células T M28z *in vivo*, se desarrolló un modelo ortotópico de mesotelioma pleural maligno usando células tumorales MSTO-211H tal como se describió previamente. Se inocularon directamente células tumorales en la cavidad pleural y se les dio tiempo suficiente (> 10 días) para establecer una gran carga tumoral antes del inicio de la terapia. Se propagó el tumor localmente a lo largo de la superficie pleural (MRI, figura 3A arriba a la izquierda), comprimió estructuras mediastínicas (figura 3A, parte superior derecha) e invadió la pared torácica (figura 3A, parte inferior). Este patrón recapituló la enfermedad humana. Se usó BLI en serie para confirmar el establecimiento del tumor antes de iniciar la terapia adoptiva con células T, y se usó posteriormente para medir la respuesta a la terapia. En este experimento, se trataron los animales 12 días después de la inoculación tumoral o bien con una única infusión intravenosa de 3×10^6 o una única administración pleural de 3×10^5 células T dirigidas a mesotelina. En ratones de control tratados con 3×10^5 células T dirigidas a PSMA, que no lisaron las dianas tumorales MSLN⁺ *in vitro* (figura 2B), la carga tumoral progresó de manera constante hasta que murieron los ratones (figuras 3B y 3C). El tratamiento con células T M28z por vía intravenosa dio como resultado una reducción retardada y de corta duración de la carga tumoral, seguida de una progresión tumoral terminal (figura 3B), lo que produjo una ventaja de supervivencia moderada de 44 días ($P = 0,0051$, figura 3D). Las células T M28z administradas por vía pleural indujeron respuestas importantes. Las cargas tumorales fueron significativamente menores el día 7 y en el nivel inicial el día 11 por las células T (figura 3B). La mediana de supervivencia no se alcanzó en este grupo ($p = 0,0013$ en comparación con i.v.). Dos de los 7 animales tratados estaban libres de tumor 200 días después de la administración pleural de células T M28z, pero ningún animal en ninguno de los otros grupos de tratamiento o control logró el aclaramiento completo del tumor (figura 3C). Los otros cuatro ratones tratados inicialmente mostraron una marcada regresión tumoral antes de la recidiva con células tumorales antigénicas negativas 100 días después de la terapia con células T (figura 3B).

La expansión de células T administrada por vía pleural es robusta y específica de antígeno

Estas observaciones condujeron a la investigación sobre si había una diferencia en la expansión de células T y la localización tumoral entre la administración intrapleural e intravenosa. Para ello, se usó el modelo animal descrito anteriormente en el que el tumor se limita al espacio pleural. Se trataron todos los ratones con células T que se transdujeron para coexpresar tanto M28z⁺ como una luciferasa de luciérnaga mejorada (effLuc) para permitir la obtención de imágenes *in vivo* de células T transducidas con CAR (figura 4A). Se observaron grandes diferencias en la distribución tisular y señales bioluminiscentes de linfocitos M28z effLuc⁺ 4 horas después de la transferencia adoptiva de 1×10^6 células T M28z⁺ effLuc⁺ en ambos grupos de tratamiento (figura 4B). La señal bioluminiscente de cuatro horas que compara ambos grupos mostró un profundo aumento de 10 veces en la acumulación pleural de células T con la administración local en comparación con la intravenosa. Las células T administradas por vía intravenosa mostraron retención pulmonar inicial y se observó una acumulación moderada de células T 8-10 días después de la administración. En cambio, las células T administradas por vía pleural mostraron una acumulación específica de antígeno profunda y sostenida durante hasta 2 semanas en comparación con las células T transducidas con effLuc sola (datos no mostrados). Los análisis mediante citometría de flujo, los recuentos de células T y la inmunohistoquímica determinaron que el número de células T era altamente concordante con las intensidades de señal bioluminiscente (figuras 4C a 4E). Además, las células T administradas por vía pleural salieron de la cavidad pleural el día 7 tras la infusión y circularon hasta sitios extrapleurales, incluido el bazo (figura 4F) y el pulmón (datos no mostrados).

Las células T-CAR coestimuladas con M28z demuestran una potente eficacia antitumoral y persistencia de células T

Para investigar la capacidad proliferativa proporcionada por la coestimulación de CD28 *in vivo*, se trataron ratones que portaban tumor pleural con células T Mz, M28z o transducidas de control a una dosis baja de 3×10^5 células T CAR⁺. Como antes, se inyectaron células T directamente en la cavidad pleural tras 18 días de crecimiento tumoral. En ratones de control tratados con 3×10^4 células T dirigidas a PSMA, la carga tumoral progresó de manera constante hasta la mortalidad (mediana de supervivencia de 36 días). El tratamiento con una dosis igual de células T Mz CAR⁺ prolongó la supervivencia en 63 días (figura 4a) y erradicó el tumor en el 20% de los ratones. La bioluminiscencia tumoral demuestra una respuesta mixta en la carga tumoral. El tratamiento con células T transducidas con receptor M28z indujo una reducción casi uniforme de la bioluminiscencia tumoral con respecto a la emisión de fondo, lo que sugiere la erradicación en la mayoría de los ratones tratados con M28z. La mediana de

supervivencia no se alcanzó en este grupo ($p = 0,01$ frente a Mz). El 60% de los ratones tratados con células T M28z estuvieron libres de tumor más de 200 días tras la infusión de células T, tal como se confirmó en una inspección macroscópica. Los otros ratones mostraron inicialmente una marcada regresión tumoral antes de la recidiva y sobrevivieron durante una media de 125 días. A mayores dosis de células T, se observó la erradicación completa del tumor en ambos grupos, lo que refleja la potencia citolítica igual de ambos receptores y demuestra la importancia de la proliferación de células T inducida por coestimulación de CD28 en una razón inicialmente baja de efector de células T con respecto a células tumorales.

La evaluación en serie de recuentos de células T CAR⁺ en la sangre periférica de los ratones tratados demostró una fuerte correlación entre la eficacia antitumoral y la supervivencia mejorada de células T. Los ratones tratados con M28z demostraron una persistencia mejorada de células T en todas las mediciones semanales, incluyendo en los puntos de tiempo tardíos, días 40 y 50 tras la infusión de células T (figura 6B). Se obtuvieron resultados similares en tres dosis independientes de células T (3×10^6 , 1×10^6 y 3×10^5) de células T CAR⁺ administradas y sobre la cuantificación absoluta de células T CAR⁺ en el bazo en los días 14 y 55 tras la infusión de células T.

La evaluación del fenotipo de las células T persistentes demostró un enriquecimiento progresivo en las células T CD4⁺ que fue estadísticamente significativo 30 días tras la infusión de células T en ratones tratados con Mz y M28z. Este hallazgo se observó de manera sistemática independientemente de la dosis de células T o del tejido analizado (bazo o sangre). Este enriquecimiento fue más pronunciado para los ratones tratados con Mz, lo que sugiere dos explicaciones alternativas para un papel diferencial de los subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺ en la eficacia de CAR. O bien es responsable la mayor cantidad absoluta de células T CD4⁺ predominantes de una eficacia mejorada de M28z o bien es la capacidad de la coestimulación de CD28 para mantener una proporción significativa de células T CD8⁺ la que es responsable, en última instancia, de la eficacia antitumoral. Para abordar estas dos posibilidades, se compararon directamente las células T CD4⁺ y CD8⁺ transducidas con CAR con respecto a su eficacia antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

Las células T-CAR CD4⁺ demuestran una potente citotoxicidad que depende de la señalización coestimuladora de CD28

Para comparar las funciones efectoras de las células T-CAR CD4⁺ y CD8⁺, se purificaron ambos subconjuntos de células T a una pureza > 98% (figura 6A). Tras 4 h de cocultivo, las células T CD8⁺ fueron el único subconjunto que demostró citotoxicidad (figura 6B, parte izquierda); sin embargo, después de 18 h de cocultivo, las células T M28z CD4⁺ mediaron en una citotoxicidad equivalente en comparación con células T M28z CD8⁺.

Dado que la coestimulación de CD28 puede mejorar la citólisis o bien a través de la potenciación inducida por IL-2 de la citotoxicidad de las células T o bien la secreción de TNF- α , una citocina capaz de inducir directamente la apoptosis de células tumorales, se evaluó el papel de la coestimulación de CD28 en la citotoxicidad mediada por CAR. La señalización coestimuladora de CD28 mejoró la lisis por las células T-CAR M28z CD4⁺ en el 13-16% en razones de efector múltiple con respecto a diana ($p < 0,0001$), pero no mejoraron de manera sistemática la lisis por células T-CAR CD8⁺ ($p = 0,07$).

Para determinar el mecanismo por el cual la señalización de CD28 mejora la citotoxicidad de las células T-CAR, CD4⁺, se estimularon células T-CAR M28z con células tumorales que expresan mesotelina y se realizaron ensayos de citotoxicidad de transferencia de sobrenadante. La transferencia de sólo sobrenadante o la transferencia de sobrenadante además de las células T transducidas de control no dio como resultado una lisis detectable (figura 6D). Como control positivo, M28z CD4⁺ lisó las dianas positivas para mesotelina. En cambio, la transferencia de sobrenadante rico en citocinas (concentraciones de citocinas confirmadas mediante el ensayo con Luminex) obtenida a partir de células T M28z CD4⁺ estimuladas mejoraron la citotoxicidad tanto de células T-CAR M28z CD4⁺ (mejora del 5 al 23%, $p < 0,0001$) como M28z CD8⁺ (mejora del 5 al 30%, $p < 0,001$). En paralelo a la observación de que la coestimulación mejora la lisis de células T-CAR CD4⁺ con cinética retardada, el sobrenadante mejoró la lisis en menor grado tras un cocultivo a corto plazo de 4 h (del 2,5 al 4% para CD4⁺, del 1,0 al 4,4% para CD8⁺, datos no mostrados).

Por tanto, la señalización coestimuladora de CD28 proporcionada en *cis* con respecto al reconocimiento de antígeno fomenta la generación de efectores citotóxicos de células T-CAR con cinética retardada y de la manera más prominente en el subconjunto de células T CD4⁺.

La citotoxicidad mediada por células T CAR⁺ depende de la ruta de granzimas/perforinas

Habiendo excluido la lisis directa de los dianas tumorales por el sobrenadante rico en citocinas, se estudió cuál de los dos mecanismos líticos dependientes de contacto celular (ruta de Fas/FasL o granzima/perforina) es responsable de la citotoxicidad de las células T-CAR. El bloqueo por anticuerpos de la interacción ligando de Fas/receptor Fas no redujo la lisis de las células diana por las células T-CAR Mz o M28z ($p > 0,05$, figura 7A, parte inferior). La citometría de flujo confirmó la expresión del ligando de Fas por las células T-CAR y la expresión del receptor Fas en tumor MSTO MSLN⁺ (figura 7A, parte superior). Las células MSTO MSLN⁺ eran susceptibles a la citotoxicidad mediada por FasL y el Ac $\square$ FasL usado en los experimentos bloqueó este efecto (figura 7A, parte inferior derecha).

El bloqueo de la liberación de granzimas mediante la adición de quelante de calcio EGTA al cocultivo de células

T/células tumorales redujo la lisis mediada por CAR en todos los grupos sometidos a prueba ($p < 0,0001$, figura 7B), lo que demuestra que la citotoxicidad de las células T-CAR depende de la ruta de granzimas/perforinas. La reducción observada de la citotoxicidad usando concentraciones iguales de EGTA (4 mM) varió entre los grupos. La reducción más prominente de la lisis se observó en grupos de células T Mz (reducción media del 27,6% frente al 17,6% para M28z) y CD8⁺ (29,4% para Mz CD8⁺ frente al 15,3% para Mz CD4⁺; 24,2% para M28z CD8⁺ frente al 11,1% para M28z CD4⁺).

Se realizó citometría de flujo intracelular para correlacionar los resultados de los ensayos de citotoxicidad con la expresión de las granzimas A y B, dos de los principales mediadores de la lisis inducida por perforinas-granzimas. La expresión de las granzimas A y B en PBMC en reposo se restringió principalmente a células T CD8⁺, en concordancia con estudios previos (figura 7C). La expresión de la granzima A no se alteró significativamente tras la estimulación con PHA y la estimulación específica de mesotelina de células T transducidas con CAR. En cambio, la granzima B se caracterizó por expresión inducible. Tras la estimulación con PHA, aproximadamente el 75% de ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ se tiñeron positivamente y a las 18 h después de la estimulación con células tumorales que expresan mesotelina, la granzima B se expresó en > 95% de células T-CAR M28z CD4⁺ y CD8⁺. Para comparar las células T CD4⁺ y CD8⁺ con respecto a la cinética de la expresión de granzima B, se estimularon las células durante 4 o 18 h y se cuantificó la IFM de granzima B. Las células T M28z CD8⁺ demostraron un aumento de 1,8 veces en IFM después de 4 h de cocultivo y una expresión de granzima B regulada por incremento adicional de 0,8 veces más durante las 12 h finales. Sin embargo, las células T M28z CD4⁺ regularon por incremento la expresión de granzima B en un grado mucho mayor durante las últimas 12 h de cultivo (1,5 veces durante 4 h, unas 2,2 veces adicionales durante las 12 h finales, resultados similares obtenidos en otros dos experimentos independientes). Estos hallazgos pueden reflejar la cinética retardada de la citotoxicidad observada con células T-CAR CD4⁺ tal como se demuestra en la figura 6B. Además, la señalización coestimuladora de CD28 mejoró la expresión de granzima B en ambos subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺ (figura 7D, expresión tras cocultivo durante 18 h), reflejando posiblemente la citotoxicidad mejorada observada con células T M28z CD4⁺ (en comparación con células T Mz CD4⁺, figura 6C) y la resistencia relativa de las células T M28z al bloqueo de liberación de granzimas (figura 7B).

La coestimulación de CD28 proporciona una proliferación y secreción de citocinas superiores en células T CD4⁺

Para evaluar la contribución relativa de la coestimulación de CD28 en respuestas proliferativas y de citocinas de células T *in vitro* a la activación de antígeno en subpoblaciones de células T, CD4⁺, CD8⁺ y se activaron células T globales transducidas o bien con Mz o bien con M28z con células tumorales que expresan mesotelina y se cuantificaron la secreción de citocinas Th1 así como la proliferación específica de antígeno. En comparación con células T CD8⁺, las células T CD4⁺ transducidas con Mz mostraron niveles aumentados de secreción de citocinas Th1, esta diferencia se incrementó con la coestimulación de CD28 observada en las células T M28z (figura 2A). Tal como se esperaba, la estimulación recurrente en ausencia de ligandos coestimuladores no indujo la expansión de células T en ninguno de las poblaciones de células T Mz CD4⁺ o CD8⁺ e indujo rápidamente una disminución del número de células T después de la primera estimulación en ausencia de IL-2 exógena (figura 2B). En cambio, la coestimulación proporcionada a las células T M28z CD4⁺ desencadenó una proliferación media 20 veces mayor por la 3ª estimulación en comparación con un aumento de 2 veces en células T M28z CD8⁺.

Las células T-CAR M28z CD4 son eficaces por sí solas *in vivo* y median en una eficacia mejorada en comparación con las células T-CAR M28z CD8

Las observaciones de una potente función efectora *in vitro* de las células T M28z CD4⁺ condujeron a la hipótesis de que las células T M28z CD4⁺ demostrarían eficacia *in vivo* incluso cuando se administran en ausencia de células T CD8⁺. Se trataron ratones portadores de tumor con células T M28z CD4⁺, M28z CD8⁺ o M28z sin clasificar globales que se administraron en la cavidad pleural a tres dosis diferentes tras 18 días de crecimiento tumoral. En ratones de control tratados con la mayor dosis de 3×10^5 células T CAR⁺, la carga tumoral progresó de manera constante hasta que los ratones tuvieron que sacrificarse (mediana de supervivencia de 28 días). El tratamiento con células T M28z CD4⁺ y T-CAR M28z globales dieron como resultado la erradicación tumoral en el 100% de los ratones, permaneciendo los ratones libres de tumor hasta 200 días de seguimiento. Las células T M28z CD8⁺ extendieron la supervivencia por encima de las células transducidas de control en 83 días (111 frente a 28 días, $p = 0,003$), pero dieron como resultado la erradicación tumoral en sólo 3/7 ratones. El tratamiento con células T-CAR M28z CD4⁺ extendió significativamente la supervivencia en comparación con ratones tratados con M28z CD8⁺ (ms no alcanzado frente a 111 días, $p = 0,02$). A las dosis menores, los resultados fueron similares al comparar la eficacia de la terapia con CAR M28z CD4⁺ con CD8⁺ (a la dosis de 1×10^5 , 112 frente a 67 días, $p = 0,04$ y a la dosis de 3×10^4 160 frente a 37, $p = 0,001$). Estos resultados ilustran que las células T-CAR CD4⁺, capaces de mediar en la lisis además de sus funciones más tradicionales de proliferación y producción de citocinas son superiores a la terapia con células T-CAR CD8⁺. Además, el potencial proliferativo de las células T M28z CD4⁺ confieren la capacidad de alcanzar razones E:D eficaces incluso a dosis en las que la razón E:D inicial es de 1:10.000.

La persistencia funcional de la transferencia adoptiva está mediada predominantemente por CD4⁺ y aumentado por la coestimulación de CD28

Se evaluó la importancia de células T persistentes en el control continuo del tumor mediante la realización de un experimento de reexposición al tumor. Se inocularon los ratones inicialmente con MSTO pleurales MSLN⁺ y se les

administraron 1×10^5 células T pleurales Mz o M28z, una dosis que erradica casi uniformemente el tumor en ambos grupos (figura 4). 87 días después de la inyección inicial de células T, se administraron 1×10^6 células tumorales MSTO o bien MSLN⁺ o bien MSLN⁻ en la cavidad peritoneal y se siguió la carga tumoral mediante BLI. Después de un aumento inicial de la carga tumoral en todos los ratones, se observó un control específico de antígeno de la carga tumoral en los ratones tratados con células T tanto Mz como M28z con una mayor disminución observada en los ratones M28z (figura 10). Se examinó la respuesta proliferativa de células T en los ratones. Los ratones de todos los grupos se sacrificaron el día 16 después de la reexposición y se extrajeron los bazo tal como se describió anteriormente. Las células T M28z sometidas a reexposición a antígeno mostraron una expansión 4 veces mayor del número de células T en comparación con la reexposición de tumor negativo para antígeno (figura 10C). Esta profunda diferencia en la acumulación de células T dentro del bazo se debió predominantemente a la subpoblación CD4⁺ (figura 10D).

4. Discusión

Un diana principal de la inmunoterapia contra el cáncer es generar una potente respuesta inmunitaria primaria y establecer la persistencia de células T. Los tumores sólidos plantean retos importantes para estas dianas dado que están ubicados dentro de compartimentos anatómicos que impiden el tráfico de células T y, normalmente, carecen de expresión de ligandos coestimuladores. Usando el modelo murino establecido de mesotelioma pleural, este ejemplo muestra que las células T modificadas por ingeniería genética para seleccionar como diana el antígeno del cáncer y proporcionar señalización coestimuladora erradican el mesotelioma pleural establecido en la mayoría de los ratones (figura 5). Este ejemplo demuestra que las propiedades potenciadoras de la señalización coestimuladora se amplifican particularmente por el subconjunto CD4, tal como demuestra su proliferación y secreción de citocinas superiores en comparación con células T CD8⁺ (figura 8). Además, la transducción de las células T CD4⁺ con receptores de antígeno quimérico coestimulados recluta este subconjunto en la respuesta citotóxica primaria (figura 6). La adquisición del potencial citotóxico combinado con la capacidad de retener la secreción de citocinas cooperadoras Th1 forma potentes efectores inmunitarios CD4⁺ capaces de eliminar de manera independiente xenoinjertos de mesotelioma pleural (figura 10). Esta eficacia antitumoral es especialmente prominente cuando las células T se administran directamente en la cavidad pleural, lo que da como resultado un control completo del tumor a dosis de células T drásticamente menores en comparación con la administración intravenosa. El secuestro pulmonar se identifica como un impedimento clave para la infiltración tumoral eficiente por las células T administradas por vía intravenosa (figura 4). En cambio, la administración de células T pleurales da como resultado infiltración tumoral temprana y una proliferación robusta tras el encuentro con el antígeno. Sorprendentemente, las células T administradas de manera regional migran fuera de la cavidad pleural a la circulación sistémica (figura 4) y, en combinación con la señalización coestimuladora, demuestran la persistencia funcional a largo plazo tras la reexposición al tumor 100 días después de la infusión inicial de células T (figura 10). Estos hallazgos demuestran que la terapia con CAR puede ser particularmente útil para superar los obstáculos impuestos por los tumores sólidos mediante el reclutamiento exitoso de las células T CD4⁺ como mediadores primarios de la eficacia antitumoral y mediante el uso de la administración regional para lograr una potente inmunidad primaria y secundaria.

En este ejemplo, el secuestro pulmonar se identificó como un impedimento clave que limita el tráfico eficiente de células T al tumor sólido. La obtención de imágenes bioluminiscentes de las células T marcadas con luciferasa demuestra que el secuestro pulmonar prolongado de las células T administradas por vía intravenosa produce un retardo en la acumulación tumoral pleural (figura 4). El retardo en la infiltración tumoral por las células T por vía i.v. concordó con una regresión retardada en la carga tumoral (figura 3). Estos resultados corroboran estudios previos que demuestran que el tráfico y la infiltración eficientes de tumores periféricos se correlacionan con la eficacia antitumoral en cánceres sólidos, y sugieren el secuestro pulmonar como un motivo principal para la acumulación tumoral escasa de células T administradas por vía intravenosa. El secuestro pulmonar puede deberse en parte al estado de activación de las células T CAR⁺ transducidas que requieren activación para una transducción retroviral eficiente. Una consecuencia funcional de la activación es un aumento de la afinidad de integrinas de adhesión que se unen a los ligandos expresados de manera constitutiva por la vasculatura pulmonar. Además de un retardo en el tráfico observado con la administración i.v., también se observó una disminución absoluta de la acumulación de células T dentro del tumor pleural en comparación con la administración pleural (figura 4). El bajo nivel de acumulación tumoral puede deberse al tráfico ineficiente de células T-CAR a los tejidos periféricos, que requiere generalmente señales adicionales, tales como la regulación por disminución de L-selectina y la regulación por incremento de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión. Según estos estudios, la mayoría de las células T transducidas con CAR en la administración son positivas para L-selectina y es posible que no puedan transitar de manera eficiente al tumor pleural, un problema que debe abordarse en futuros estudios. Otras estrategias que tienen como objetivo optimizar el suministro de células T a tumores sólidos han sobreexpresado receptores de quimiocinas para mejorar la acumulación tumoral. Los requisitos de tráfico pueden eludirse mediante el enfoque clínicamente relevante de administrar células T de manera regional, directamente en la pleura que porta el tumor. La administración pleural sortea tanto el secuestro pulmonar como cualquier sesgo de tráfico intrínseco al fenotipo de células T. La activación de células T resultante y la potente respuesta proliferativa dan como resultado una eficacia antitumoral aumentada. Es importante destacar que las células T administradas por vía intrapleural pueden salir de la cavidad pleural y circular por toda la periferia, persistir en puntos de tiempo a largo plazo de hasta 200 días y establecer una vigilancia tumoral sistémica > 100 días tras su infusión inicial (figura 10).

Los hallazgos de que las células T coestimuladas con CD28 demuestran una secreción de citocinas superior y

proliferan tras la exposición a antígeno repetida en ausencia de IL-2 exógena (figura 1), lo que concuerda con otros modelos de antígeno de cáncer-receptor quimérico. Las células T-CAR M28z eliminaron el tumor pleural incluso a dosis bajas de células T, lo que ilustra la importancia de la coestimulación para proporcionar la capacidad proliferativa necesaria para lograr razones eficaces de células T con respecto a tumor *in vivo*. Además, la coestimulación de CD28 mejoró la persistencia de células T (figura 5) y proporcionó un control tumoral superior tras una reexposición secundaria > 100 días tras su administración inicial. Sorprendentemente, las células T M28z experimentaron una proliferación robusta después de la reexposición de antígeno, lo que demuestra el funcionamiento persistente de la señalización coestimuladora (figura 10). Esto subraya la importancia de la coestimulación para el control completo de grandes cargas tumorales y sugiere que las células T coestimuladas son menos susceptibles al agotamiento en presencia de estímulo antigénico crónico. La inclusión de señalización coestimuladora para mejorar la proliferación y la persistencia de células T-CAR *in vivo* se ha traducido recientemente en una remisión del cáncer a largo plazo en ensayos de tumores malignos hematopoyéticos. Las recidivas tardías de tumores positivos para antígeno observadas en algunos ratones después de la regresión tumoral inicial sugieren que las células T-CAR administradas a dosis bajas de células T pueden estar reguladas negativamente por la inmunosupresión mediada por tumor. Los estudios preclínicos en curso abordarán si la combinación de la transferencia de CAR coestimuladora y la inversión dirigida de estas rutas inhibitorias en la misma célula mejorará adicionalmente la eficacia antitumoral.

Estudios previos han reforzado el requisito de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ para una inmunidad antitumoral óptima. Tradicionalmente se piensa que las células T CD8⁺ desempeñan el papel principal en la eliminación de las células cancerosas, mientras que las células T CD4⁺ proporcionan a las células T CD8⁺ factores de crecimiento tales como IL-2 que son necesarios para una función óptima. Aunque los resultados que se muestran en este ejemplo concuerdan con una gran cantidad de trabajo que respalda la importancia de la ayuda de células T CD4⁺ en la facilitación de la formación de efectores de CD8⁺ óptimos y en el mantenimiento de la respuesta de células T CD8⁺ al virus o tumor persistente, también destacan una creciente apreciación de que las células T CD4⁺ pueden actuar como mediadores primarios de la eficacia antitumoral. *In vitro*, las células T-CAR CD4⁺ coestimuladas con CD28 secretan una mayor cantidad de citocinas (figura 8), fueron capaces de manera única de proliferar tras la estimulación antigénica repetida sin complementación con IL-2 exógena (figura 8), y presentaron una citotoxicidad equivalente en comparación con células T CD8⁺ (figura 6). La adquisición del potencial citotóxico combinado con la capacidad para retener la secreción de citocinas cooperadoras Th1 forma potentes efectores inmunitarios CD4⁺ capaces de eliminar xenoinjertos de mesotelioma pleural tras administración regional. Esta observación contrasta con estudios previos que usan células T-CAR. La falta de eficacia de las células T-CAR CD4⁺ en estos estudios puede explicarse por un bajo nivel de expresión de CAR y el uso de receptores de primera generación que carecen de señalización coestimuladora. Puesto que las células T CD4⁺ requieren una mayor interacción de avidéz para mediar en las funciones efectoras en comparación con las células T CD8⁺ y puesto que la avidéz funcional está determinada en parte por el nivel de expresión de receptor, el alto nivel de expresión de receptor obtenido en este ejemplo puede explicar la potencia de CD4⁺. Además, debido a que los receptores de antígeno quimérico implementan scFv de alta afinidad para el reconocimiento de antígeno que aumenta adicionalmente la avidéz, la terapia con CAR puede ser especialmente adecuada para generar células T CD4⁺ multifuncionales capaces de ayudar a las células T y e citotoxicidad. Se han usado con éxito otras estrategias para aumentar la avidéz de las células T para generar células T CD4⁺ citotóxicas en la terapia transgénica de TCR antitumoral. El estudio que se muestra en este ejemplo ayuda a informar sobre la comprensión de que los factores que rigen la avidéz funcional además de pistas ambientales que regulan la respuesta de células T, dictan los papeles relativos de células T CD4⁺ frente a CD8⁺ en la inmunidad antitumoral.

La adquisición de actividad citotóxica por células T CD4⁺ transducidas con CAR es especialmente llamativa. Estudios publicados recientemente realizados usando modelos transgénicos de TCR de inmunidad antitumoral también demuestran la capacidad de las células T CD4⁺ para diferenciarse en efectores citotóxicos. En estos informes, la capacidad de las células T CD4⁺ para eliminar independientemente tumores dependía de alcanzar la linfopenia en ratones receptores. Los regímenes de linforreducción se usan para mejorar la eficacia de la terapia con células T modificadas por ingeniería genética, actuando en parte aumentando la disponibilidad de citocinas de cadena γ capaces de estimular la expansión de las células T y programar la diferenciación citotóxica. Otras estrategias clínicas para aumentar la disponibilidad de citocinas incluyen la administración de IL-2 sistémica, aunque la eficacia mediante la administración i.v. está limitada por el suministro ineficiente al tumor. La modificación genética de las células T promete lograr la activación completa de células T CAR⁺ reactivas a tumores sin el uso de linforreducción de manera que se suministre eficientemente IL-2 al sitio de activación de células T dentro del microentorno tumoral. En este ejemplo, la incorporación de señalización coestimuladora de CD28 en el sentido de 3' del reconocimiento de antígeno mejoró la Citotoxicidad de células T CD4⁺ (figura 6) por una ruta dependiente de perforina/granzima (figura 7), que se correlaciona con la capacidad de células T-CAR CD4⁺ coestimuladas para expresar altos niveles de granzima B tras la estimulación con antígeno. Este efecto se potenció por las citocinas secretadas, cada vez más disponibles por la señalización de CD28; mientras que las citocinas eran incapaces de mediar en la lisis tumoral directa, la adición de un sobrenadante rico en citocinas a las células T CD4⁺ condujo a una citotoxicidad mejorada (figura 6). Estos hallazgos están respaldados por otros estudios que demuestran un papel dependiente de IL-2 en la capacidad de coestimulación para producir células CD4⁺ citotóxicas. Dada su robusta producción de IL-2, las células T CD4⁺ coestimuladas están en una posición única para servir como potentes efectores inmunitarios, especialmente cuando están equipados con receptores CAR que proporcionan interacciones

de alta avidéz con el antígeno tumoral.

En conclusión, este ejemplo proporciona evidencia que respalda el uso de la administración regional de células T-CAR para superar los obstáculos que plantean los tumores sólidos. El reclutamiento exitoso de las células T CD4⁺ en todos los aspectos de la inmunidad antitumoral proporcionan una ventaja particular al uso de la terapia con células T CAR⁺ para el tratamiento de tumores sólidos.

Ejemplo 2: Terapia dirigida de células T para el cáncer de mama metastásico

1. La expresión de MSLN en TNBC se correlaciona con agresividad: Se evaluó la expresión de MSLN en microalineamientos de tejido de 226 TNBC y 88 cáncer distinto de TNBC. El análisis reveló que la sobreexpresión de MSLN fue significativamente más frecuente en TNBC que en cáncer distinto de TNBC (36% frente a 16%, respectivamente; $p = 0,0006$; figura 12). Los pacientes con TNBC positivo para MSLN desarrollaron metástasis más a distancia con intervalos más cortos (véase la tabla 1) y tuvieron una supervivencia global y libre de enfermedad significativamente menores que los pacientes con TNBC negativo para MSLN, lo que indica que la expresión de MSLN es un marcador de agresividad. Los resultados muestran que los pacientes con TNBC MSLN⁺ es una población potencial para ensayos de terapias dirigidas a MSLN. Con una mediana de seguimiento de 5,3 años (intervalo, 0,7 - 8,2), las estimaciones de supervivencia de Kaplan-Meier a 5 años mostraron que TNBC tenía una probabilidad de supervivencia global significativamente más corta, en 0,82 (IC del 95%: 0,75-0,87), en comparación con 0,959 (IC del 95%: 0,895-0,984) para cáncer distinto de TNBC (figura 13A). Entre los pacientes con TNBC, la positividad de MSLN se correlacionó con una supervivencia global (OS, *overall survival*) significativamente más corta (0,659 [IC de 95%: 0,515-0,770] versus 0,913 [IC de 95%: 0,838-0,954]) (figura 13B), así como significativamente más corta supervivencia libre de enfermedad (DFS) (0,665 [IC de 95%: 0,536-0,766] frente a 0,865 [IC de 95%: 0,785-0,916]) (figura 13C). El impacto negativo en la supervivencia de MSLN es independiente del estado de los ganglios linfáticos (prueba de rangos logarítmicos, $p = 0,0003$). Los casos de TNBC con ganglio positivo/MSLN⁺ fueron los peores (probabilidad de OS a 5 años, 0,564 [IC de 95%: 0,348-0,733]), en comparación con los casos de TNBC de ganglio positivo/MSLN⁻ (0,865 [IC de 95%: 0,699-0,943]) (figura 13D). Dentro de los pacientes con TNBC, los pacientes positivos para mesotelina tuvieron una supervivencia global disminuida ($p = 0,001$); supervivencia específica de enfermedad disminuida ($p = 0,08$); frecuencia aumentada de metástasis a distancia (OR 2,9, $p = 0,011$); intervalo medio hasta metástasis a distancia disminuido (19 frente a 35 meses, $p = 0,006$); supervivencia media disminuida (24 frente a 53 meses, $p = 0,001$), tal como se muestra en las figuras 13E y 14F.

Tabla 1

	TNBC MSLN (+)	TNBC MSLN (-)	Cáncer distinto de TNBC
Metástasis a distancia (+)	16/70* (23%)	12/128* (9%)	8/88 (9%)
Intervalo de metástasis (meses) (IC del 95%)	19,2 (13,5-24,9)	35,2 (23,8-46,6)	35 (28,7-41,3)
Hueso	2 (13%)	2 (17%)	6 (75%)
Cerebro	10 (63%)	4 (33%)	2 (25%)
Hígado	2 (13%)	2 (17%)	4 (50%)

SMRP en suero como marcador de progresión de la carga tumoral: Los datos publicados han establecido el papel de la medición en serie de SMRP en suero (una prueba clínica convencional para pacientes con mesotelioma) como marcador de progresión de la carga tumoral, por ejemplo, como marcador de progresión en pacientes con adenocarcinoma de esófago y pulmón (figura 14). Por tanto, la medición de SMRP en suero es una prueba de laboratorio clínico convencional que puede aplicarse fácilmente a la población de pacientes con TNBC.

CAR específicos de MSLN: se creó un CAR dirigido a MSLN derivado de un anticuerpo humano contra MSLN (scFv) y un gen indicador de eGFP separado por un ligador de IRES (Mz), tal como se describe en el ejemplo 1. Tal como se describe en el ejemplo 1, se incorporó el dominio citoplasmático del receptor CD28 para construir un CAR M28z de segunda generación para mejorar la proliferación de células T, la secreción de citocinas y la supervivencia. Los constructos de vector se transdujeron con éxito en subconjuntos de células T humanas CD4 y CD8, según se detecta por el gen indicador de eGFP. La citotoxicidad *in vitro* usando ensayos de liberación de cromo convencionales, en los que se incubaron células T dirigidas a MSLN o de control con unas células cancerosas MSLN⁺, mostró la destrucción eficaz y específica de unas células MSLN⁺ por las células T transducidas tanto con Mz como con M28z. Las células T-CAR M28z secretaron una cantidad aproximadamente 2 veces mayor de GM-CSF, IFN- γ y TNF- α , en comparación con las células T Mz. La secreción de IL-2, una citocina crucial para la supervivencia y proliferación de células T, la proporciona de manera única M28z. En presencia de IL-2 exógena, se expandieron células T transducidas con receptores específicos de MSLN, y las células coestimuladas con CD28 lograron una respuesta proliferativa 3 veces mayor que la lograda por las células T-CAR Mz. Además, en ausencia de IL-2 exógena, sólo las células T-CAR M28z pudieron acumularse tras la estimulación con antígeno repetida.

La citotoxicidad mediada por células T CAR⁺ depende de la ruta de granzimas/perforinas: tal como se describe en el

ejemplo 1, se determinó cuál de los dos mecanismos líticos dependientes de contacto celular (ruta de Fas/FasL o de granzimas/perforinas) es responsable de la citotoxicidad de las células T-CAR. El bloqueo por anticuerpos de la interacción ligando de Fas/receptor Fas no redujo la lisis de las células diana por las células T-CAR Mz o M28z ($p > 0,05$). La citometría de flujo confirmó la expresión del ligando de Fas por las células T-CAR y la expresión del receptor Fas en tumor MSLN⁺. Las células MSLN⁺ eran susceptibles a la citotoxicidad mediada por FasL, y el anticuerpo contra FasL usado en los experimentos bloqueó este efecto. En cambio, el bloqueo de la liberación de granzimas mediante la adición del quelante de calcio, ácido etilenglicol-tetraacético (EGTA) al cocultivo de células T/células tumorales redujo la lisis mediada por CAR tanto en Mz como en M28z, así como en ambos subconjuntos CD4 y CD8 ($p < 0,0001$), demostrando que la citotoxicidad de células T-CAR depende de perforina/granzima.

Desarrollo de modelos de ratón: Para facilitar la investigación de la terapia dirigida pleural y sistémica para TNBC que expresa MSLN, los inventores desarrollaron y validaron tres modelos animales distintos.⁸⁵⁻⁹⁰ Los tumores resultantes se parecen anatómicamente a la enfermedad humana para lesiones pulmonares pleurales o bien ortóticas o bien metastásicas (figuras 15A, B y C, respectivamente). Estos modelos animales se validaron para el uso de obtención de imágenes bioluminiscentes (BLI) no invasiva^{85-89,91-93} para seguir la pista de la progresión de tumores usando líneas celulares eGFP⁺, MSLN⁺ y luciferasa de luciérnaga⁺. Estos tumores retuvieron la expresión de MSLN, incluyendo en estadios avanzados de la enfermedad (datos no mostrados). Es importante destacar que los ratones se inocularon con tumor y se obtuvieron imágenes semanalmente con protocolos optimizados para SMRP en suero secretado mediante BLI, un biomarcador de suero fiable, y se correlacionó con la medición y la progresión de la carga tumoral (figuras 15A, B y C, parte inferior). En las inserciones se muestran ratones con metástasis demostradas mediante BLI o MRI.

Eficacia antitumoral de una única dosis baja de células T CAR⁺ M28z en un modelo de ratón con metástasis pulmonar que expresa MSLN: Una única dosis de células T transducidas con M28z por vía intravenosa, tras 22 días de crecimiento tumoral metastásico, disminuyó eficazmente la carga tumoral, tal como se observa mediante una mediana de supervivencia aumentada, en comparación con ratones de control ($p < 0,05$ frente a control) (figura 16), demostrando, por tanto, la capacidad de las células T M28z administradas de manera sistémica para erradicar múltiples lesiones tumorales en un modelo de metástasis pulmonar.

Las células T transducidas con M28z administradas de manera regional erradican el tumor pleural: Tal como se describe en el ejemplo 1, después del establecimiento de una gran carga tumoral pleural metastásica, se trataron los animales 18 días después de la inoculación tumoral (figura 3E) con una única infusión intravenosa o una única administración intrapleural de células T dirigidas a MSLN. En ratones tratados con células T transducidas de control administradas por vía pleural, la carga tumoral progresó de manera constante (figura 17B) hasta que murieron los ratones (figura 3C). El tratamiento con una dosis menor de células T M28z por vía intravenosa dio como resultado una reducción retardada de la carga tumoral (figuras 3B y C), lo que produjo una ventaja de supervivencia ($p = 0,005$; figura 3D). Las células T M28z administradas por vía pleural indujeron respuestas importantes. Las cargas tumorales fueron significativamente menores en el día 7 y en el nivel inicial en el día T 11 (figura 3B). La mediana de supervivencia no se alcanzó, logrando la mayoría de los ratones la erradicación tumoral (figura 17D).

Las células T-CAR M28z demuestran una potente eficacia antitumoral, y la persistencia funcional de las células T aumenta con la coestimulación de CD28: Tal como se describe en el ejemplo 1, en ratones con tumor MSLN⁺ pleural establecido a los que se administraron células T pleurales o bien Mz o bien M28z, tras la erradicación tumoral, ambos grupos presentaron persistencia de células T-CAR de ambos subconjuntos CD4 y CD8 (figura 10A). Ochenta y siete días después de la inyección inicial de células T, se administraron células tumorales o bien MSLN⁺ o bien MSLN⁻ en la cavidad peritoneal, y se siguió la carga tumoral mediante BLI (figura 10E, parte superior). Se observó un control específico de antígeno de la carga tumoral en los ratones tratados con células T tanto Mz como M28z, con una mayor disminución observada en los ratones tratados con M28z (figuras 10C y 10E). Se sacrificaron los ratones el día 16 después de la reexposición, y se extrajeron sus bazos. Las células T M28z sometidas a reexposición a tumor positivo para antígeno mostraron una expansión de 4 veces de células T, en comparación con el tumor negativo para antígeno (figura 10D). Esto demuestra que las células T-CAR son capaces de persistir en la periferia y presentar proliferación cuando se someten a reexposición a tumor, un efecto que se ve aumentado por la coestimulación de CD28.

Las células T M28z median en la destrucción por vecindad específica de antígeno de dianas con baja expresión de MSLN: Dada la heterogeneidad de la expresión de MSLN en determinados cánceres sólidos, incluyendo en TNBC, se evaluó la citotoxicidad de las células T M28z frente a dianas heterogéneas que expresan MSLN. Después de 16 h de cocultivo con fibroblastos de pulmón MRC-5 (MSLN⁻), las células T M28z no demostraron lisis (figura 17A). Se evaluó la citotoxicidad de las células T M28z frente a dianas que expresan MSLN, que se compone de una mezcla 1:1 de una línea celular que expresa de manera natural bajos niveles de MSLN (bajo MSLN) y una línea celular transducida para expresar altos niveles de MSLN (alto MSLN). Para examinar la lisis específica, sólo las líneas celulares con bajo MSLN se marcaron con ⁵¹-cromo y se mezclaron con células con alto nivel de MSLN sin marcar y posteriormente se cocultivaron con células T M28z o de control. Después de 16 h de cocultivo, se observó citólisis específica de células con bajo nivel de MSLN por células T M28z en presencia de dianas con alto nivel de MSLN (figura 17B), superando la lisis de líneas celulares con bajo nivel de MSLN sólo en aproximadamente el 5% -15% en cada razón de efector con respecto a diana ($p < 0,05$). Es importante destacar que, en comparación con las células T M28z no activadas, las células T M28z preactivadas con antígeno no mostraron un aumento de la citotoxicidad o la

destrucción inespecífica frente a las células con bajo nivel de MSLN o los tumores negativos para MSLN (figuras 17C y 17D). Por tanto, las células T M28z demuestran citólisis específica de antígeno aumentada frente a células con bajo nivel de MSLN en presencia de tumor con alto nivel de MSLN.

Tráfico *in vivo* de células T-CAR dirigida a MSLN demostrado mediante BLI de células T: Tal como se describe en el ejemplo 1, para determinar el tráfico y la proliferación de células T *in vivo*, se optimizaron la doble transducción de células T humanas con CAR M28z y luciferasa de luciérnaga mejorada (effLuc). Las células T administradas por vía pleural presentaron una intensidad creciente sólo en ratones portadores de tumor, en comparación con ratones no portadores de tumor, lo que significa la proliferación de células T específicas de MSLN (figura 4A, dorsal y ventral). Comparativamente, las células T M28zG-effLuc⁺ administradas de manera sistémica presentaron retención pulmonar inmediatamente después de la administración, con una emisión creciente de señal pleural después de unos días (figura 4B). Se optimizó la monitorización de la respuesta de las células T mediante el uso de obtención de imágenes no invasiva, permitiendo la visualización del tráfico, así como la cuantificación de la proliferación de células T en respuesta al antígeno.

CAR específicos de MSLN con dominio coestimulador 4-1BB para investigar la eficacia contra células cancerosas que expresan inhibidores de la función de las células T: Para investigar la influencia de los cánceres que expresan normalmente proteínas inhibidoras para evadir el sistema inmunitario, se usaron células que expresan PD-L1 (el color negro en la figura 18, en comparación con el control de isotipo, en color rojo) y secretan citocinas inhibidoras tales como TGF- β se caracterizaron y confirmaron mediante ELISA. Por tanto, estas células permiten modelar la eficacia antitumoral *in vivo* de las células T-CAR dentro de un MET inhibidor. Para estudiar la capacidad de las células T-CAR para superar la inhibición mediada por tumor, se proporcionaron receptores que, tras el reconocimiento de antígeno, proporcionan una señalización coestimuladora de 4-1BB (MBBz; figura 19). Se transdujeron eficazmente células T humanas primarias con CAR específicos para MSLN a frecuencias del 60% al 70%.

La coestimulación de CD28 y 4-1BB dirigida a MSLN mejora la función de las células T-CAR en presencia de proteínas inmunosupresoras secretadas por el tumor: se modificaron por ingeniería células de fibroblastos de ratón 3T3 para expresar o bien MSLN (3T3 MSLN⁺; figura 20A, parte superior) o bien tanto MSLN como PD-L1 (3T3 MSLN⁺ PD-L1⁺; figura 20A, parte inferior) y se añadió TGF- β exógeno a cocultivos de células T/3T3 MSLN⁺ (figura 21A) como sustituto de un MET adverso. Tras la estimulación con 3T3 MSLN⁺PD-L1⁺ (formas sin relleno; 3T3 MSLN⁺, formas con relleno), las células T CAR⁺ coestimuladas secretan una menor cantidad de citocinas, en comparación con la estimulación con 3T3 MSLN⁺. Sin embargo, las células T coestimuladas continuaron secretando una mayor cantidad de citocinas que las células T Mz incluso en presencia de PD-L1 ($p < 0,005$). Además, el bloqueo del ligamiento de PD-L1/PD-1 con 10 μ g/ml de anticuerpo bloqueo de PD-L1 rescató la secreción de citocinas para todos los grupos de células T (el rescate se muestra con formas con relleno de color azul; $p < 0,02$, comparando Mz con bloqueo de PD-L1 con Mz sin bloqueo; $p = 0,02$ para IFN- γ para MBBz; $p < 0,02$ para M28z, pruebas de la t para datos independientes), lo que demuestra adicionalmente la especificidad de la inhibición mediada por PD-L1 y sugiere un papel para bloqueo del eje PD-L1/PD-1 en la mejora de la terapia con células T-CAR. Con respecto a la proliferación, sólo las células T-CAR M28z y MBBz fueron capaces de expandirse en presencia de sobreexpresión de PD-L1 ($p < 0,05$, a los 7 y 14 días). De manera similar a la inhibición mediada por PD-L1, la adición de TGF- β también disminuyó la secreción de citocinas de todos los grupos de células T-CAR, pero una vez más las células T CAR⁺ coestimuladas continuaron secretando una mayor cantidad de citocinas, en comparación con las células T CAR⁺ Mz ($p < 0,003$; figura 21B). En respuesta a la estimulación específica de MSLN en presencia de TGF- β , las células T-CAR MBBz todavía fueron capaces de expandirse tras dos estimulaciones sucesivas ($p < 0,002$; figura 21C). Se demostró que la señalización coestimuladora mejoraba la función de las células T-CAR incluso en presencia de proteínas inhibidoras prominentes expresadas en tumores.

IL-12 como coestimulante en la terapia adoptiva de células T: Se caracterizó que el constructo de CAR M28zIL12, cuando se transdujo en células T, secretaba IL-12. Tanto las células M28z como M28zIL12, pero no las células no transducidas, mediaron en la lisis específica de células cancerosas MSLN⁺ con aproximadamente el mismo efecto (figura 22). Usando un ensayo ELISA/LUMINEX, se demostró que, con el cocultivo con células tumorales que expresan antígeno, las células T-CAR IL-12 aumentaron la secreción de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α y GM-CSF) (figura 23) e inhibieron la producción de citocinas Th2 (IL-13, IL-4 e IL-5) en comparación con las células T-CAR M28z.

Ejemplo 3 - Generación del vector retroviral SFG-iCASP9-2A-M28z

El vector SFG empleó las repeticiones terminales largas (LTR) en 5' y 3' del VLMu-Mo para la expresión del CAR iCASP9-2A-M28z. La transcripción del CAR iCASP9-2A-M28z estaba bajo el control de las secuencias potenciadoras y promotoras presentes en la región U3 de la 5'LTR y del sitio de poliadenilación presente en la región R de la 3'LTR. Además, el vector retuvo las secuencias ψ necesarias para la encapsidación eficiente de genomas retrovirales recombinantes en partículas virales y las secuencias donadora y aceptora de corte y empalme retroviral usadas para la generación del ARN retroviral subgenómico que codifica para la proteína env en el VLMu-Mo. Se insertó la secuencia de iCASP9-2A-M28z de modo que su codón de iniciación estuviese en la posición ocupada normalmente por el ATG de env viral en el transcrito viral subgenómico. Los análisis de transferencia de tipo Northern demostraron que esta estrategia de clonación aumentó cuatro veces la razón de ARN de vector sometido a

corte y empalme con respecto a no sometido a corte y empalme por copia de vector con relación a un vector gammaretroviral convencional (Krall y Kohn, 1996, Expression levels by retroviral vectors based upon the N2 and MFG backbones. Gene Ther 3, 365).

5 Se construyó SFG-iCASP9-2A-M28z (tal como se muestra en las figuras 31 y 32) insertando dos fragmentos de ADN en un sitio NotI/BglII de 6,7 kb de la estructura principal de SFG. La estructura principal codifica para lo siguiente: (1) todo el vector $\square$ -retroviral SFG, excepto por una región que abarca el SA y 5'UTR del ARNm que codifica para env de VLM-Mo; y (2) la CDS del dominio de señalización de CD28 humano fusionado con el dominio de señalización de CD3 ξ humano.

10 El fragmento de ADN 1 era un fragmento BglII/BspEI de 1,5 kb derivado del constructo plasmídico SFG-iC9-41BBL-NY28z. Este fragmento codificaba para una región que abarca el SA y 5'UTR del ARNm que codifica para env de VLM-M0 fusionado a la CDS de iCASP9 que carece de ocho aminoácidos del extremo C-terminal y el codón de terminación. Se obtuvo la CDS de iCASP9 mediante síntesis *de novo* de Blue Heron Bio.

15 El fragmento de ADN 2 era un fragmento BspEI/NotI de 0,89 kb derivado de un producto de PCR de 0,979 kb. Este fragmento codificaba para la CDS C-terminal de iCASP9 (sin el codón de terminación) fusionado con el scFv GSG-P2A-CD8a leader_m912. Este producto de PCR se sintetizó a partir de SFG-TK-2A-M28z como molde usando los siguientes cebadores:

(1) Cebador izquierdo de iCASP9-2A: gcgctccggaaaaaaccttttctttaaacatc

aggatctggagcaacaacttc [SEQ ID NO: 37]

(2) Cebador derecho de CD28: ggtgtttccctttcacatgg [SEQ ID NO: 38].

20 La secuencia de aminoácidos de P2A se expone en SEQ ID NO: 39, que se proporciona a continuación:

ATNFSLLKQAGDVEENPGP [SEQ ID NO: 39]

La secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 se expone en SEQ ID NO: 40, que se proporciona a continuación:

GCAACAAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCC

[SEQ ID NO: 40]

25 Se derivó el molde SFG-TK_2A_M28z usando la estructura principal SFG-Hsvtk_P2A_P28z y la secuencia de scFv CD8a leader_m912 en SFG-M28z_ires_hrGFP mediante PCR de extensión solapada. La secuencia de scFv CD8a leader_m912 en SFG-M28z_ires_hrGFP se derivó mediante síntesis *de novo* de Blue Heron Bio usando una tabla de codones optimizados para la expresión. La generación del vector retroviral de SFG-Hsvtk_P2A_P28z SFG/TK_2A_P28z se derivó de SFG/TP28z.3 usando un ligamiento de 3 partes: (1) un fragmento BglII/BssHII de 1462 pb derivado de SFG-TP28z.3 que codifica para una región del vector de VLM-Mo que contiene el sitio aceptor de corte y empalme fusionado con el gen HSV-TK; (2) un fragmento BssHII/NotI de 880 pb derivado del producto de PCR que codifica para el extremo 3' del gen HSV-TK sin el codón de terminación_GSG_2A_péptido señal de CD8a_ScFv J591; y (3) un fragmento NotI/BssHII de 6652 pb derivado de SFG-TP28z.3 que codifica para el resto de la cadena transmembrana_CD28_zeta del receptor de antígeno quimérico más la parte restante de la estructura principal del vector retroviral. Se amplificó el producto de PCR usando un ADN de plásmido construido previamente que codifica para GSG_P2A_CD28z como molde. Se usaron los siguientes cebadores: (1) Directo

HSVTK_linker_GSG_P2A:GCGCGCGCGCACGTTTGCCCGGGAGATGGGGGA

GGCTAACGGATCTGGAGCAACAACTTC [SEQ ID NO: 41]

(2) Inverso- P28z R:

ggtgtttccctttcacatgg [SEQ ID NO: 42]

40 2. La generación del vector retroviral SFG-iC9-41BBL-NY28zSFG-iC9-41BBL-NY28z se generó insertando dos fragmentos en una cadena principal de AgeI/NotI de 6,8 kb derivada de SFG-Hsvtk_2A_P28z: (1) fragmento AgeI/SacII de 1,7 kb derivado de pUC(-mcs)-CBNI que codifica para el SD de VLM-Mo y la 5'-UTR del ARNm de env fusionado a toda la CDS de iCASP9 y el 4-1BBL N-terminal fusionado en marco con el péptido de escisión gsg_P2A; y (2.) fragmento SacII/AgeI de 1,5 kb derivado de pUC(-mcs)-CBNII que codifica para la CDS de 4-1BBL C-terminal restante fusionada a través de otro péptido de escisión GSG_P2A a un scFv dirigido al antígeno NYESO-1.

45 Tanto pUC(-mcs)-CBNI como pUC(-mcs)-CBNII se obtuvieron de Blue Heron Bio y los insertos se generaron mediante síntesis *de novo* del gen.

Ejemplo 4 - El nivel de expresión de CAR está asociado con la eficacia de las células T que expresan CAR

Se generaron poblaciones de células T con niveles de expresión variables de CAR M28z usando subclones de líneas celulares de empaquetamiento 293T. Se usó un CAR de segunda generación dirigido a un marcador de CD como control negativo (CAR de control). Un constructo retroviral que codifica para M28z se muestra en la figura 27A. Tal como se muestra en la figura 27A, el constructo comprende un indicador, GFP. Se transdujeron células T humanas CD3⁺ con M28z y el CAR de control. Las células T expresaron diferentes niveles de M28z, tal como se muestra en la figura 27B. Las células T con un nivel de expresión de M28z de aproximadamente 4 o más números de copia de vector/célula se clasificaron como "M28z alto". Las células T con un nivel de expresión de M28z de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 números de copia de vector/célula se clasificaron como "M28zT medio", y las células con un nivel de expresión de M28z de menos de aproximadamente 1 número de copias de vector/célula se clasificaron como "M28z bajo". Los números de copias de vector de células T no transducidas y transducidas se midieron mediante PCR cuantitativa, tal como se muestra en la figura 27C. Se generaron cuatro líneas celulares diana que expresaban niveles variables de mesotelina de superficie: Met5a, EKVX, MSTO M y OVCAR-3. Met5a era una línea celular mesotelial humana inmortalizada con antígeno T grande de SV40. EKVX era una línea celular de cáncer de pulmón que expresaba mesotelina de manera natural. MSTO M era la línea celular MSTO-211H transducida para sobreexpresar mesotelina humana. OVCAR-3 era una línea de cáncer de ovario que expresaba mesotelina de manera natural. Tal como se muestra en la figura 28, entre estas cuatro líneas celulares diana, MSTO M tenía el mayor nivel de expresión de mesotelina humana, y Met5a tenía el menor nivel de expresión de mesotelina humana. Las cuatro líneas celulares diana se cocultivaron o bien con células T M28z⁺ o bien con las células T de control CAR⁺. Se evaluó la producción de citocinas o secreción de células T M28z⁺ en las cuatro líneas celulares diana. Tal como se muestra en las figuras 29A y 29B, sólo las células T con el mayor nivel de expresión de M28z presentaron secreción de citocinas específica de antígeno a las células diana Met5a, que tenían el menor nivel de expresión de mesotelina humana entre las cuatro líneas celulares sometidas a prueba. Los niveles de expresión crecientes del CAR M28z dio como resultado una secreción de citocinas dependiente de la dosis a las células diana MSTO, que tenían el mayor nivel de expresión de mesotelina humana entre las cuatro líneas celulares sometidas a prueba. En comparaciones por parejas que usan la corrección de Bonferroni, la secreción de citocinas fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en (1) alto nivel de expresión de M28z frente a los otros tres efectores tanto para las células T sólo como para las dianas Met5a; y (2) todas las comparaciones entre grupos en el caso de las células diana MSTO M.

Además, se evaluó la citotoxicidad de las células T M28z⁺ frente a las cuatro líneas celulares diana mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr convencionales. Se incubaron células T que expresaban diversas densidades de CAR M28z, células diana Met5a, células diana MSTO MSLN⁺ y células diana EL4PSMA⁺ MSLN⁻ durante 18 horas a diferentes razones E:D. Se usaron células diana EL4PSMA⁺ MSLN⁻ como control negativo. Tal como se muestra en la figura 30, sólo las células T con un alto nivel de expresión de M28z mostraron citotoxicidad frente a las células diana Met5a, que tenían el menor nivel de expresión de mesotelina humana entre las cuatro líneas celulares sometidas a prueba. Además, tal como se muestra en la figura 30, el nivel de expresión de CAR determinó el grado de citotoxicidad frente a las células diana MSTO, que tenían el mayor nivel de expresión de mesotelina humana entre las cuatro líneas celulares sometidas a prueba.

Ejemplo 5 - El nivel de expresión de mesotelina está asociado con la eficacia de las células T que expresan CAR

Se usó una única línea celular de mesotelioma (MSTO 211-H) y se transdujo con un nivel bajo o alto de MSLN humana, tal como se muestra en la figura 31A. Se determinó la citotoxicidad de células T M28z⁺ mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr convencionales tal como se describió anteriormente, y se muestran los resultados en la figura 31B. Se determinó la producción de citocinas mediante un ensayo de secreción de citocinas, y se muestran los resultados en la figura 31C. Tal como se muestra en las figuras 31B y 31C, la citotoxicidad y la producción de citocinas de las células T M28z⁺ fueron proporcionales al nivel de expresión de MSLN humana. Por ejemplo, cuanto mayor es el nivel de expresión del MSLN humana, mayor es la citotoxicidad y la producción de citocinas de las células T.

Ejemplo 6 - Generación de CAR específico de MSLN con niveles de expresión opcionales

Se obtuvo un scFv derivado del anticuerpo m912. Se realizó la optimización de codones del anticuerpo m912 basándose en cuatro algoritmos diferentes (por ejemplo, algoritmos Blue Heron y Encore). Se combinaron las secuencias de optimización de codones obtenidas de los cuatro algoritmos, y se retiraron todas las GPC y BAM-H1 para una clonación óptima. La secuencia de nucleótidos de codones optimizados era homóloga en aproximadamente el 70% al scFv m912 original. Para obtener una expresión eficiente en una célula inmunorreactiva (por ejemplo, células T primarias humanas), la secuencia de nucleótidos de codones optimizados se ligó a una secuencia líder de CD8 humano, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para SEQ ID NO: 20. La secuencia líder de CD8 proporcionó una escisión de señal óptima que precede a la cadena pesada de ScFv (QVQL). La optimización de codones optimizó la expresión de CAR de mesotelina en una célula inmunorreactiva, por ejemplo, múltiples células T primarias de donantes humanos, con buena eficiencia de transducción. Se sometieron a prueba múltiples números de copias de vector de CAR en células T de donantes múltiples para determinar la eficacia funcional, la especificidad y la sensibilidad frente a múltiples células de cánceres hematológicos y sólidos con expresión de mesotelina variable. El CAR de mesotelina basado en m912 con codones optimizados con un número de copias de vector de 1-4 proporcionó citotoxicidad altamente eficiente frente a dianas de alta expresión de mesotelina, pero mínima reactividad frente a dianas de baja expresión de mesotelina, es decir, tejido normal, que es

una característica clave lograda para la seguridad del vector sin comprometer la eficacia. La modificación por ingeniería genética innovadora descrita anteriormente en la generación de un CAR de mesotelina específico que es reactivo frente a células cancerosas que expresan alto nivel de mesotelina mientras evita el tejido normal que expresa bajo nivel de mesotelina es óptima para su uso como vector clínico para la terapia contra el cáncer al tiempo que garantiza la seguridad.

Ejemplo 7 - La administración regional de la terapia con células T-CAR dirigidas a mesotelina genera inmunidad tumoral dependiente de CD4 potente y de larga duración - Actualización del ejemplo 1

1. RESUMEN

Para traducir el éxito reciente de la terapia con células T-CAR para tumores malignos hematológicos a tumores sólidos, será necesario superar varios obstáculos, incluyendo la infiltración ineficiente de tumores de células T y la persistencia funcional insuficiente. Aprovechando un modelo ortotópico que imita fielmente el tumor maligno pleural humano, se evaluaron dos vías de administración de células T dirigidas a mesotelina usando el CAR M28z. Se descubrió que las células T-CAR administradas por vía intrapleural superaron ampliamente a las células T infundidas de manera sistémica, requiriendo 30 veces menos células T M28z para inducir remisiones completas a largo plazo. Después de la administración intrapleural de células T, la inmediata activación *in vivo* de células T inducida por antígeno permitió una expansión robusta de las células T-CAR y la diferenciación de efectores, lo que dio como resultado una mayor eficacia antitumoral y una persistencia funcional de las células T durante 200 días. La administración regional de células T también fomentó la eliminación eficiente de sitios tumorales extratorácicos. Esta eficacia terapéutica dependía de la activación temprana de células T CD4⁺ asociada con mayores razones de células CD4/CD8 intratumorales y la citotoxicidad mediada por células T CD4⁺ dependiente de CD28. En cambio, las células T-CAR administradas por vía intravenosa, incluso cuando se acumularon en cantidades equivalentes en el tumor pleural, no lograron una activación, erradicación o persistencia tumorales comparables. La capacidad de las células T administradas por vía intrapleural para circular y persistir respalda el concepto de administrar una terapia óptima de células T-CAR a través de "centros de distribución regionales". Basándose en estos resultados, está realizándose un ensayo clínico de fase 1 para evaluar la seguridad de la administración intrapleural de células T-CAR dirigidas a mesotelina en pacientes con tumores malignos pleurales primarios o secundarios.

1. INTRODUCCIÓN

Los tumores malignos pleurales, tanto primarios (mesotelioma pleural maligno, MPM) como metastásicos (de cáncer de pulmón y de mama), afectan a más de 150.000 pacientes al año sólo en los EE.UU.¹⁰⁸. MPM es una enfermedad regional agresiva con opciones de tratamiento limitadas¹⁰⁹. Algunos estudios han notificado el mejor pronóstico de tener mayores niveles de linfocitos infiltrantes de tumor en MPM¹¹⁰⁻¹¹³, lo que sugiere que la inmunoterapia basada en células T puede ser beneficiosa para pacientes con MPM¹¹⁴.

Las inmunoterapias dirigidas que usan CAR para redirigir y reprogramar las células T del paciente han mostrado recientemente resultados alentadores en algunos tumores malignos de células B, especialmente la leucemia linfoblástica aguda y el linfoma no Hodgkin^{11,115,116,117}. Los CAR son receptores sintéticos que redireccionan las células T a los antígenos de superficie tumoral.^{21,118} El advenimiento de los CAR de segunda generación, que combinan dominios de señalización activantes y coestimuladores, ha permitido el diseño de células T potentes que pueden mediar en respuestas completas en pacientes con tumores malignos CD19⁺ resistentes a la quimioterapia^{11,115,116,117}. El potencial terapéutico de las terapias con CAR frente a cánceres sólidos sigue siendo desconocido. Un aspecto crítico de idear una terapia con CAR para cualquier tumor sólido es la identificación de un antígeno diana válido. La mesotelina (MSLN) es una molécula de superficie celular asociada con la invasión regional, una característica de MPM en el que se sobreexpresa en más del 90% del MPM epitelioides³⁷. En los estudios clinicopatológicos de los inventores que evaluaron de manera sistémica la expresión y la intensidad del MSLN, se encontró una expresión de MSLN fuerte a intermedia en el 69% de los adenocarcinomas de pulmón (n = 1209)¹¹⁹, el 36% de cáncer de mama triple negativo (n = 355) y el 46% de adenocarcinoma de esófago (n = 125)⁴⁷. La expresión de MSLN se asoció de manera sistemática con la agresividad tumoral y la disminución de la supervivencia.^{37,47,119} Colectivamente, estas observaciones respaldan el direccionamiento a MSLN en MPM y otros cánceres sólidos^{114,120-122}.

Los CAR dirigidos a mesotelina han mostrado previamente actividad en un modelo subcutáneo de mesotelioma^{55,56,123}. Sin embargo, las terapias dirigidas de células T no se han estudiado en modelos ortotópicos. Para ello, se estableció un modelo de ratón de MPM clínicamente relevante que recapitula los rasgos característicos de la enfermedad humana.^{37,85,86} Los tumores pleurales establecidos encierran estructuras pulmonares y mediastínicas con invasión regional, muestran linfangiogénesis extensa y desarrollan metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos. Este modelo no sólo abordó si las células T-CAR podían erradicar el tumor, sino que también estudió dos vías potenciales de administración de células T: la administración intravenosa sistémica convencional y la administración intrapleural regional. Se planteó la hipótesis de que la administración sistémica puede ser superior debido a una mejor infiltración de la enfermedad pleural difusa, los ganglios linfáticos mediastínicos y sitios metastásicos ocasionales, que pudieron modelarse. Sorprendentemente, se descubrió que la administración de células T regional, es decir, intracelular, era muy superior, no sólo frente a la enfermedad pleural sino también frente a sitios tumorales diseminados. Esta observación provocó la investigación de la base de tal

eficacia terapéutica.

En este ejemplo, se notificó el potencial terapéutico de la terapia regional con células T-CAR para tumores sólidos y se destacó la importancia de la activación temprana de antígeno de las células T-CAR CD4⁺ para lograr una mayor eficacia antitumoral. Además, los hallazgos, que demuestran el claro beneficio de la terapia regional en un modelo de enfermedad clínicamente relevante, pueden traducirse inmediatamente para el tratamiento de MPM y tumores pleurales metastásicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El propósito de este estudio era crear una inmunoterapia óptima con células T para tumores malignos sólidos. Se diseñaron receptores de antígeno quimérico dirigidos a mesotelina que, cuando se transducen en células T humanas, proporcionan reconocimiento de antígeno tumoral y función efectora específica de antígeno. *In vitro*, se analizaron (i) la citotoxicidad, (ii) la secreción de citocinas y (iii) la proliferación de células T. Los experimentos *in vivo* analizaron estrategias para optimizar la terapia con células T usando la obtención de imágenes *in vivo* tanto de células T como de tumores. Se usaron ratones inmunodeficientes con células cancerosas humanas y células T humanas para validar y facilitar la traducción del presente CAR M28z a la clínica, tal como se hizo anteriormente para CD19 (Brentjens, NM, 2003) y PSMA (Gade, CR, 2005). El estudio de las interacciones mecánicas entre las células T-CAR y el sistema inmunitario endógeno se estudiaría mejor en un modelo de ratón inmunocompetente, que sin embargo tendría que usar un CAR murino diferente de su homólogo clínicamente relevante. Los procedimientos experimentales los aprobó el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC). Cada experimento se realizó varias veces usando células T de donantes diferentes (las células T nunca se agruparon). Los datos presentados usaron un experimento representativo (con réplicas de muestra de más de tres) para evitar variables de confusión tales como diferencias debidas a eficiencias de transducción, variabilidad relacionada con el donante y razones E:D.

Líneas celulares

Se transdujeron células MSTO-211H (mesotelioma pleural humano) y EL4 (timoma murino) de manera retroviral para expresar la proteína de fusión de GFP/luciferasa de luciérnaga (MSTO GFP-ffLuc⁺). Estas células se transdujeron luego con la variante 1 de MSLN humana subclonada en un vector retroviral SFG para generar MSTO MSLN⁺ GFP-ffLuc⁺.

Construcción del vector gammaretroviral y producción viral

Para generar CAR específicos de MSLN, se modificó por ingeniería una proteína de fusión que codifica para un scFv completamente humano, m912 (donado amablemente por D. Dimitrov, NCI-Frederick)⁵³ ligado al péptido líder de CD8 humano y las secuencias de CD8/CD3 ξ o CD28/CD3 ξ tal como se describió previamente¹⁷. Dentro de la estructura principal del vector gammaretroviral SFG (proporcionado amablemente por I Riviere, MSKCC), se insertó un sitio de entrada al ribosoma interno para facilitar la expresión bicistónica de CAR con el gen indicador de GFP recombinante humanizado. Los plásmidos que codifican para Mz, M28z y P28z se transfectaron luego en líneas celulares de empaquetamiento 293T H29 tal como se describió previamente²⁰.

Aislamiento de células T, transferencia génica y aislamiento de CD4/CD8

Se aislaron leucocitos de sangre periférica de la sangre de donantes voluntarios sanos con un protocolo aprobado por la junta de revisión institucional. Se aislaron PBMC activadas por PHA mediante centrifugación de baja densidad en Lymphoprep. Dos días después del aislamiento, se transdujeron las PBMC con sobrenadante producido por 293T RD114 que contenía los vectores Mz, M28z o P28z durante 1 hora en placas recubiertas con retronectina 15 μ g/ml diariamente durante 2 días. Después de permitir durante 3 días la expresión del vector, se mantuvieron las PBMC transducidas en 20 unidades/ml de IL-2. Se determinaron las eficiencias de transducción mediante análisis por citometría de flujo. Se obtuvieron poblaciones puras de células T CD4⁺ y CD8⁺ a través de protocolos de selección negativa usando kits de aislamiento de células T CD4 y CD8 humanas Dynabeads Untouched.

Ensayos de citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad de las células T transducidas con un control de CAR o vector mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr convencionales tal como se describió previamente¹⁵³.

Modelo animal de mesotelioma pleural ortotópico y evaluaciones *in vivo*

Para desarrollar el modelo de ratón ortotópico de mesotelioma pleural, se usaron ratones NOD/SCID gamma hembra de 6 a 10 semanas de edad. Se realizaron todos los procedimientos con protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y oxígeno inhalados y se les administró bupivacaína para la analgesia. Se realizó la inyección intrapleural directa de 1×10^5 a 1×10^6 células tumorales en 200 μ l de medio libre de suero a través de una incisión en la parte derecha del tórax para establecer

tumores de MPM ortotópicos, tal como se describió previamente^{85,86,92,154}. En total, se transfirieron de 3×10^4 a 3×10^6 células T transducidas de manera adoptiva a ratones que portaban tumor, con 200 μ l de medio libre de suero, a la cavidad torácica de los ratones mediante inyección intrapleural directa o de manera sistémica mediante inyección en la vena de la cola. Se obtuvo sangre periférica mediante sangrado retroorbitario.

5 Ensayos de detección de citocinas

Se realizaron ensayos de liberación de citocinas mediante el cocultivo de 5×10^5 a 5×10^3 células T transducidas con M28z, Mz o vector de control con 5×10^3 células diana en 200 μ l de medio en placas de fondo redondo de 96 pocillos por triplicado. Después de 6 a 24 h de cocultivo, se recogieron los sobrenadantes. Se determinaron los niveles de citocinas usando el kit de detección de citocinas humanas de perlas multiplex.

10 Ensayos de proliferación de células T

En total, se estimularon de 1×10^6 a 3×10^6 células T transducidas con M28z, Mz o P28z sobre células MSTO-211H irradiadas con o sin expresión de MSLN y se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 o 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 a 3×10^5 células/pocillo. Se realizaron ensayos de proliferación en ausencia o presencia de 20 U/ml de IL-2 exógena, tal como se indicó. Se contaron las células cada 4 o 7 días y luego se superpusieron sobre células MSTO-211H irradiadas con o sin expresión de MSLN. Se representó gráficamente el número de células frente al tiempo para cada grupo de células T, y se determinaron los fenotipos mediante análisis por citometría de flujo.

Análisis histológico e inmunotinción

Se realizó la evaluación histopatológica de los tumores después de tinción con hematoxilina y eosina de muestras de tejido fijadas con paraformaldehído al 4% incrustadas en parafina. El análisis inmunohistoquímico para MSLN humana se realizó con una IgG de ratón anti-MSLN humana. La tinción con anticuerpo anti-CD3 humano se realizó con una IgG de ratón anti-CD3 humano.

Citometría de flujo

Se detectó la expresión de MSLN humana usando una IgG de rata anti-MSLN humana conjugada con PE o conjugada con APC_{2a}. Se determinaron los fenotipos de células T con anticuerpos monoclonales para CD3, CD4, CD8, CD62L, CD25, CD27 y CD45RA. Se realizó una citometría de flujo posterior para GFP, expresión de MSLN y análisis de fenotipo de células T en un citómetro LSR II y se analizó usando el software de análisis FlowJo. Se procesaron los tejidos de ratón de la siguiente manera: se pesaron los tejidos y se recogieron en RPMI-1640 enfriado con hielo. Se sometieron los tejidos a morselizado manualmente con un bisturí y luego se desagregaron mecánicamente a través de filtros de 40-100 μ m. Se resuspendieron las muestras y se registraron 2×10^6 eventos en FACS.

BLI cuantitativa y de células T *in vivo*

Se realizó BLI en ratones usando una única dosis intraperitoneal de 150 mg/kg de d-luciferina para el gen indicador effLuc o de luciérnaga (proporcionado amablemente por el Dr. Patrick Hwu, Texas)^{86,155}. Se obtuvieron imágenes de células transducidas con M28z y un gen indicador de luciferasa de *Gaussia* con una única dosis intravenosa de 15 μ g de coelenterazina nativa resuspendida en 150 μ l de propilenglicol:PBS (1:1)¹⁵⁶. Se analizaron los datos de BLI usando el software Living Image 2.60 y se notificó la señal de BLI como flujo total (fotones/s). Se determinó luego el flujo de BLI (fotones/s) como el promedio de imágenes ventrales y dorsales con Microsoft Excel (Microsoft Corp., WA) y se analizó con GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA).

40 Métodos estadísticos

Los datos se presentan como medias $\pm$ D.E. o E.E.M. tal como se indica en las leyendas de las figuras. Se analizaron los datos mediante la prueba t de Student de datos independientes (bilateral) con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples cuando sea aplicable. Se analizaron las curvas de supervivencia con la prueba de rangos logarítmicos. La significación estadística se definió como $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism versión 6,0 (GraphPad).

4. RESULTADOS

Las células T transducidas con Mz y M28z responden específicamente a las células diana MSLN⁺

Dos CAR que incorporan un scFv específico de MSLN humana⁵³ y se construyeron dominios de señalización o bien CD3 ξ o bien CD28/CD3 ξ (Mz y M28z, figura 2A). El CAR P28z, específico para el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA)¹⁷, sirvió como control negativo para la alorreactividad y la xenorreactividad. Se transdujeron eficazmente linfocitos T de sangre periférica humana tanto CD4⁺ como CD8⁺ usando el vector gammaretroviral SFG (transducción del 60-75%, figura 2B). Las células MSTO-211H transducidas con MSLN (MSLN⁺) y de linfoma de ratón EL-4 transducidas con PSMA (MSLN⁻) proporcionaron dianas positivas y negativas de MSLN usadas para experimentos *in vitro* (figura 43A). Las células T transducidas con Mz y M28z demostraron una lisis específica de

MSLN similar *in vitro* (figura 35A). Las células T-CAR P28z no lisaron MSTO MSLN⁺ y las CAR dirigidas a mesotelina no lisaron EL4 PSMA⁺. Tal como se esperaba para los CAR de segunda generación¹⁵, las células T-CAR M28z secretaron una cantidad de citocinas Th1 de 2 a 5 veces mayor (figura 43B) y permitieron una mayor acumulación de células T tras la exposición repetida a células MSLN⁺ en ausencia o presencia de IL-2 exógena (figura 2E). Basándose en estos hallazgos, se procedió a evaluar el potencial terapéutico de M28z en ratones que portaban tumores pleurales establecidos.

La administración regional de células T M28z es más potente que la vía sistémica

En un modelo ortotópico de MPM previamente establecido por el laboratorio de inventores^{37,85,86,93}, se usó la obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) en serie usando MSTO-211H transducidas con luciferasa de luciérnaga (fLuc) para confirmar el establecimiento del tumor, igualar la carga tumoral entre los grupos de intervención antes del inicio de la terapia con células T y medir la respuesta al tratamiento. Los ratones con tumor pleural establecido se trataron 12 días después de la inoculación tumoral con una única administración o bien intravenosa o bien intrapleural de 1×10^5 células T-CAR M28z (razón de efector con respecto a diana [E:D] de 1:3000, estimada a partir de la cuantificación de la carga tumoral tal como se describió anteriormente)^{85,86}. Se administraron el CAR P28z o células T no transducidas a la misma dosis para demostrar la especificidad de antígeno y el control de la alorreactividad y la xenorreactividad. El tratamiento con células T M28z por vía intravenosa a esta dosis dio como resultado una eficacia antitumoral marginal (figura 35B), apenas superando a las células T de control P28z (figura 35C, línea de color azul discontinua frente a línea continua de color negro, MS. 27 días frente a 25, respectivamente). En cambio, las células T M28z administradas por vía intrapleural indujeron respuestas importantes. Las cargas tumorales fueron significativamente menores en el día 7, y se volvieron indetectables en el día 11 (figura 35B). La mediana de supervivencia no se alcanzó en el día 100 (figura 35C). El tratamiento con una dosis mayor de células T M28z por vía intravenosa (3×10^6 , un aumento de 30 veces, E:D 1:100) redujo la carga tumoral pero no evitó la progresión tumoral eventual (figuras 2B y 35D), produciendo una ventaja de supervivencia moderada de 44 días (figura 35E, línea de color azul discontinua). En cambio, una dosis 10 veces menor de células T-CAR M28z (3×10^5 , E:D 1:1000) administrado por vía intrapleural disminuyó rápidamente la carga tumoral en el plazo de 10 días desde la administración (figuras 2B y 35D) y no alcanzó la mediana de supervivencia en el día 200 (línea continua de color azul, figura 35E). Los resultados experimentales fueron similares con las células T de 3 donantes diferentes, argumentando en contra de un impacto significativo de la alorreactividad, en su caso.

A diferencia del suministro sistémico, la administración intrapleural de células T fomenta la inmediata expansión y diferenciación de células T M28z

La supervivencia libre de tumor a largo plazo observada con la terapia regional con células T-CAR, incluso a una dosis 30 veces menor que la usada por vía intravenosa, propició que se investigara la infiltración tumoral, expansión y persistencia de células T después de la administración intrapleural frente a intravenosa. Para ello, los inventores realizaron en primer lugar BLI cuantitativa, no invasiva de tumor y células T. Se trataron todos los ratones con una única dosis de células T (1×10^6) que coexpresaban M28z y luciferasa de luciérnaga mejorada (effLuc). En el plazo de las 24 horas posteriores a la administración, el suministro intrapleural dio como resultado un aumento rápido de la acumulación pleural de células T M28z, 10 veces mayor que a través de suministro intravenoso (figura 36A). Esta acumulación rápida y sostenida se produjo con M28z (figura 36B, línea de color azul) pero no con células T P28z. Las células T M28z administradas por vía intravenosa produjeron una señal comparable a las células T administradas por vía intrapleural después de 5 a 7 días. La señal BLI de células T creciente fue paralela a la regresión de la carga tumoral registrada mediante la disminución concomitante del tumor mediante BLI. Los análisis inmunohistoquímicos en serie confirmaron la cinética de acumulación de células T (figura 4D). El análisis mediante citometría de flujo adicional de la razón de células T con respecto a células tumorales reveló una acumulación similar de células T-CAR en los puntos de tiempo iniciales (día 3-5) al comparar las dos vías de administración, que sin embargo divergieron posteriormente, aumentando de manera constante en el caso de células T suministradas por vía intrapleural pero disminuyendo en los ratones tratados de manera sistémica (figura 36C). Según la adquisición diferencial de las funciones efectoras, se observaron marcadas diferencias en la razón CD4/CD8 pleural y el patrón de expresión de CD62L (L-selectina), un marcador regulado por disminución tras la activación de las células T y la formación de memoria efectora¹²⁴. Mientras que la administración intrapleural mantuvo una razón CD4/CD8 equilibrada, la administración intravenosa dio como resultado una acumulación de CD8⁺ significativamente menor (figuras 36C y 36D). La distribución equitativa de las células T CD4⁺ y CD8⁺ observada dentro del bazo de estos ratones indica que la reducción de la acumulación de CD8⁺ intratumoral no se debe a una ausencia sistémica de células T CD8⁺. Además, la mayoría de las células T CD4⁺ administradas por vía intravenosa demostraron un fenotipo de células T no activadas (CD62L⁺) 1 semana después de la administración. En cambio, una gran proporción de células T CD4⁺ administradas por vía intrapleural mostraba un fenotipo CD62L⁻ activado (figura 36F). Las células T M28z CD8⁺ mostraron una reducción similar de la expresión de CD62L en cualquier caso (figura 36F), estableciendo que la activación diferencial afectó principalmente a la activación de las células T CD4⁺ y la acumulación concomitante de células T CD8⁺.

Las células T M28z sensibilizadas de manera regional soportan respuestas potentes, sistémicas y específicas de tumor

Para evaluar si las células T administradas por vía intrapleural proporcionan protección tumoral sistémica, los inventores trataron ratones que portaban tumor pleural MSLN⁺ que expresaba luciferasa de luciérnaga, así como tumores en el flanco MSLN⁺ y MSLN⁻ (derecho MSLN⁺ e izquierdo MSLN⁻; figura 37A, parte izquierda) con células T M28z intrapleurales que expresan luciferasa de *Gaussia*. Quince días después de la administración de células T, BLI con coelenterazina demostró células T residuales en la cavidad pleural y acumulación de células T en el tumor del flanco derecho MSLN⁺ (figura 37A, parte central) pero no en el tumor del flanco izquierdo MSLN⁻. La obtención de imágenes del tumor con D-luciferina al día siguiente mostró la erradicación del tumor pleural, la regresión del tumor del flanco derecho del MSLN⁺ y la progresión del tumor del flanco izquierdo MSLN⁻ (figura 37A, parte derecha). Además, se investigó si las células T-CAR administradas por vía intrapleural podían transitar hacia la cavidad peritoneal, un sitio potencial de diseminación del mesotelioma. En este modelo de enfermedad pleural/peritoneal doble, las células T M28z administradas por vía intrapleural se acumularon rápidamente (días 1-2) y en un número mayor que las células T administradas por vía intravenosa (figuras 37B y 37C).

Las células T M28z administradas por vía intrapleural permanecen funcionales durante al menos 100 días

Habiendo demostrado la rápida activación de las células T M28z dispensadas de manera regional y su eficiente redistribución extratorácica, se examinó más a fondo su persistencia y función. Después de establecer grandes cargas de tumor pleural a lo largo de 18 días, se administraron células T Mz, M28z o P28z en la cavidad pleural a una dosis baja de 3×10^5 células T CAR⁺ (E:D, 1:1000). El tratamiento con células T M28z indujo una reducción uniforme de la bioluminiscencia tumoral con respecto a los niveles de emisión de fondo, así como una supervivencia libre de tumor a largo plazo (mediana de supervivencia no alcanzada frente a 63 días en Mz, frente a 36 días en P28z, $P = 0,01$, figura 38). La evaluación en serie de los recuentos de células T CAR⁺ en la sangre periférica de los ratones tratados demostró una persistencia aumentada de las células T en los ratones tratados con M28z en comparación con los ratones tratados con Mz (50 días después de la infusión de células T; figura 38B). Se obtuvieron resultados similares de persistencia de células T usando 3 dosis independientes de células T (3×10^6 , 1×10^6 y 3×10^5 células T CAR⁺ administradas). La evaluación del fenotipo de las células T persistentes demostró un enriquecimiento progresivo y predominante en las células T CD4⁺ 30 días después de la infusión de células T en ratones tratados tanto con Mz como con M28z (figura 5C). Este enriquecimiento gradual de CD4⁺ se observó en las 3 dosis de células T tanto en el bazo como en la sangre.

A continuación, se evaluó el estado funcional de las células T persistentes mediante la realización de un experimento de reexposición al tumor. A los ratones que portaban tumores pleurales MSLN⁺ establecidos se les administraron por vía intrapleural 3×10^5 células T Mz o M28z para erradicar el tumor pleural y fomentar la supervivencia a largo plazo. Ochenta y siete días después de la inyección inicial de células T, se administraron células tumorales o bien MSLN⁺ o bien MSLN⁻ (1×10^6) en la cavidad peritoneal a los supervivientes a largo plazo y se monitorizó la carga tumoral usando BLI. En el momento de la reexposición, las células T persistentes eran predominantemente células de memoria efectora (CD45RA-CD62L-) (figura 10A) tal como se evidencia mediante el análisis por FACS en ratones representativos. Después de un aumento inicial de la carga tumoral en todos los ratones, se observó un control específico de antígeno de la carga tumoral en los ratones tratados con células T Mz y M28z, más notablemente en los ratones tratados con M28z (figura 39). Luego, se examinó la respuesta proliferativa de células T a la exposición al tumor. Los ratones de todos los grupos se sacrificaron 16 días después de la reexposición, y se extrajeron los bazos para el análisis mediante FACS. Los ratones inicialmente tratados con células T M28z y sometidos a reexposición al tumor MSLN⁺ mostraron una expansión de células T 4 veces mayor que los sometidos a reexposición al tumor MSLN⁻ (figura 10C). La mayor acumulación de células T fue atribuible predominantemente a la subpoblación CD4⁺ en el grupo de M28z (figura 10D).

La activación de antígeno temprana de las células T M28z CD4⁺ es esencial para mejorar la eficacia de las células T-CAR

Para evaluar la contribución relativa de la coestimulación de CD28 a las repuestas de citocinas CD4⁺ y CD8⁺ y proliferativas, se estimularon células T CD4⁺, CD8⁺ y globales transducidas con Mz o M28z, con células tumorales MSLN⁺ y se cuantificó la secreción de citocinas Th1 y la proliferación. En comparación con las células T CD8⁺, las células T CD4⁺ transducidas con Mz tenían niveles aumentados de secreción de citocinas Th1 (figura 40A). Las células T CD4⁺ coestimuladas con CD28 secretaron niveles de citocinas de 11 a 50 veces mayores que las células T CD8⁺, lo que demuestra que la secreción de citocinas mejora fuertemente en las células T coestimuladas con CD28, particularmente en las células T CD4⁺. Tal como se esperaba, la estimulación repetida con dianas MSLN⁺ no indujo la expansión de las células T en la población de células T Mz ni CD4⁺ ni CD8⁺ y más bien indujo rápidamente una disminución del número de células T tras la estimulación antigénica en ausencia de IL-2 exógena (figura 40B). En cambio, las células T M28z CD4⁺ se expandieron con una proliferación media > 20 veces mayor por la tercera estimulación, en comparación con un aumento de 2 veces en las células T M28z CD8⁺ ($P < 0,001$). La importancia de las células T-CAR CD4⁺ en el respaldo de la función de células T-CAR M28z se demostró adicionalmente por la acumulación robusta de células T M28z CD8⁺ cuando se cocultivaron con células T M28z CD4⁺ y se estimularon por dianas MSLN⁺ (acumulación 3 veces mayor; $P < 0,001$; figura 40C). Para confirmar adicionalmente la función potenciadora de las células T-CAR M28z CD4⁺ *in vivo*, se transdujeron células T-CAR M28z CD8⁺ con effLuc (para monitorizar la acumulación de células T en ratones que portaban tumor pleural). Las células T-CAR M28z CD8⁺ habían mejorado significativamente *in vivo* acumulación cuando se administran con células T M28z CD4⁺, según se determina mediante el seguimiento de la emisión de señal de células T mediante BLI (aumento de 2,3 veces frente a

1,2 en la señal bioluminiscente de células T a las 72 h; figuras 40D-E).

La eficacia antitumoral mejorada de las células T M28z administradas por vía pleural podría explicarse por una activación de antígeno más temprana de las células T M28z CD4⁺ que puede conducir a una secreción óptima de citocinas para mantener la expansión de ambos subconjuntos de células T-CAR CD4⁺ y CD8⁺. Para demostrar la influencia de la activación de antígeno temprana, se realizaron experimentos de acumulación *in vitro* descritos anteriormente usando células T M28z CD4⁺ preactivadas (preactivadas una vez con células tumorales MSLN⁺ 24 horas antes). La preactivación de células T-CAR CD4⁺ dio como resultado una mejora en la acumulación tanto de CD4⁺ como de CD8⁺ *in vitro* en comparación con la condición experimental en la que las células T CD4⁺ se exponen a antígeno simultáneamente a las células T CD8⁺ (figura 40F).

Las células T-CAR CD4⁺ demuestran citotoxicidad mediada por granzimas/perforinas dependiente de CD28

Se investigó el potencial citotóxico de las células T-CAR M28z. Las células T CD8⁺ purificadas demostraron una rápida citotoxicidad a lo largo de 4 horas (figura 41A, parte izquierda). Las células T M28z⁺ CD4⁺ tenían un potencial citotóxico rápido menor pero alcanzaron niveles equivalentes a las células T M28z⁺ CD8⁺ a las 18 h. La señalización coestimuladora de CD28 mejoró la lisis por las células T-CAR M28z CD4⁺ en el 13-16% a múltiples razones E:D (P <0,001; figura 41B) pero no mejoró de manera sistemática la citólisis mediada por células T CD8⁺ (P = 0,07). La transferencia de sobrenadante rico en citocinas obtenido de células T M28z CD4⁺ estimuladas añadidas en el momento del ensayo de liberación de ⁵¹Cr mejoró la citotoxicidad de ambas células T M28z CD4⁺ (mejora del 5%-23%; P <0,0001; figura 41C) y células T-CAR M28z CD8⁺ (mejora del 5%-30%; P <0,001). La transferencia del sobrenadante solo o la adición del sobrenadante a las células T de control P28z no dio lugar a lisis (figura 41C). Por tanto, se concluyó que el CAR M28z favorece la formación de efectores citotóxicos de células T CD4⁺ y ayuda a la citotoxicidad de células T CD8⁺ de manera dependiente de CD4.

Con la lisis directa de los dianas tumorales por el sobrenadante rico en citocinas excluida, se determinó cuál de los dos mecanismos líticos dependientes de contacto celular (ruta de receptor Fas/ligando de Fas o de granzimas/perforinas) era responsable de la citotoxicidad de las células T-CAR. El bloqueo por anticuerpos de la interacción ligando de Fas/receptor Fas (FasL/FasR) no redujo la lisis de las células diana por las células T-CAR o bien Mz o bien M28z (P > 0,05; figura 7A, parte izquierda y central). El análisis mediante citometría de flujo confirmó la expresión de FasL por las células T-CAR y la expresión de FasR en el tumor MSLN⁺ (figura 7A). Las células MSLN⁺ son, de hecho, susceptibles a la citotoxicidad mediada por FasL, y el anticuerpo $\square$ FasL usado en estos experimentos bloqueó este efecto (figura 45A, parte derecha). El bloqueo de la liberación de granzimas mediante la adición del quelante de calcio EGTA al cocultivo de células T/células tumorales redujo la lisis mediada por CAR en todos los grupos sometidos a prueba (figura 41D), lo que demuestra que la citotoxicidad de las células T-CAR depende de la ruta de perforina/granzima. La reducción más prominente en la lisis se observó en los grupos de células T Mz (reducción media, el 27,6% frente al 17,6% para M28z) y CD8⁺ (el 29,4% para Mz CD8⁺ frente al 15,3% para Mz CD4⁺; el 24,2% para M28z CD8⁺ frente al 11,1% para M28z CD4⁺). La expresión de las granzimas A y B en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en reposo se restringió principalmente a las células T CD8⁺, según los resultados de estudios previos (figuras 41E y 44C). La expresión de la granzima A no se altera significativamente tras la estimulación con PHA y la estimulación específica de MSLN de células T transducidas con CAR (figura 44). La granzima B se expresó en > 95% de células T-CAR M28z CD4⁺ y CD8⁺ en el plazo de las 18 h posteriores a la estimulación con células tumorales que expresan MSLN. Las células T M28z CD8⁺ tuvieron un aumento de 1,8 veces en IFM después de 4 h de cocultivo, y la expresión de granzima B se reguló por incremento adicionalmente a 2,6 veces durante las 12 h finales. Con las células T M28z CD4⁺, sin embargo, la expresión de la granzima B se reguló por incremento en un grado mucho mayor durante las últimas 12 h de cultivo (1,5 veces durante las primeras 4 h, hasta 3,7 veces durante las 12 h finales). Estos hallazgos pueden explicar la cinética de lisis retardada que presentan las células T-CAR CD4⁺. Además, M28z mejoró la expresión de la granzima B en ambos subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺ (figura 41E, expresión tras 18 h de cocultivo), explicando posiblemente la citotoxicidad mejorada observada con las células T M28z CD4⁺ en comparación con las células T Mz CD4⁺ (figura 41B).

Las células T-CAR CD4⁺ administradas de manera regional son eficaces solas y median en la persistencia funcional

Las observaciones de una potente función efectora de M28z CD4⁺ *in vitro* y la inmunidad a largo plazo predominante de CD4⁺ conducen a la hipótesis de que las células T M28z CD4⁺ demostrarían eficacia *in vivo* en ausencia de células T CD8⁺. Se trataron ratones portadores de tumor con células T M28z CD4⁺, M28z CD8⁺, o M28z no clasificadas globales administradas en la cavidad pleural a 3 dosis diferentes tras 18 días de crecimiento tumoral (figuras 42A y 42B). En ratones tratados con P28z, la carga tumoral progresó de manera constante hasta que los ratones tuvieron que sacrificarse (mediana de supervivencia, 28 días). El tratamiento con células T M28z CD4⁺ y T-CAR M28z globales (3 $\times$ 10⁵; E:D, 1:1000) dio como resultado la erradicación tumoral en el 100% de los ratones, permaneciendo los ratones libres de tumor durante 200 días de seguimiento. El tratamiento con células T M28z CD8⁺ amplió la supervivencia sólo 83 días (111 días frente a 28; P = 0,003; figura 42B) y logró la erradicación tumoral en sólo 3 de 7 ratones. Incluso a las dosis menores, las células T-CAR M28z CD4⁺ tenían mayor eficacia que las células T-CAR CD8⁺ (1 $\times$ 10⁵; E:D, 1:3000, 112 días frente a 67 [P = 0,04]; 3 $\times$ 10⁴; E:D, 1:10000, 160 días frente a 37 [P = 0,001]). Estos resultados ilustran que las células T-CAR CD4⁺ solas son superiores a las células T-CAR CD8⁺ solas, aunque no son tan eficaces como las células T CD4⁺ y CD8⁺ combinadas.

Finalmente, para abordar si las células T CD4⁺ pueden establecer una persistencia funcional a largo plazo cuando se administran sin células T CD8⁺, se realizó una reexposición a tumor peritoneal en ratones 196 días después de la administración intrapleural inicial de células T M28z clasificadas CD4⁺ o globales. Aunque hubo un aumento inicial de la carga tumoral con las células T M28z CD4⁺ persistentes en comparación con la población global que contenía tanto CD4⁺ como CD8⁺, los tumores experimentaron entonces regresión y se controló el crecimiento tumoral posterior durante > 4 semanas (figura 42C).

5. DISCUSIÓN

Se usó un modelo de MPM ortotópico que imita fielmente la enfermedad humana.^{37,85,86,93} para evaluar dos vías de administración para tratar la enfermedad pleural maligna con células T dirigidas a MSLN. Se descubrió que las células T-CAR administradas por vía intrapleural superaron ampliamente a las células T infundidas de manera sistémica, lo que indujo remisiones completas a largo plazo con menos de 30 veces menos células T-CAR M28z. Las células T-CAR administradas de manera regional presentaron una expansión de células T rápida y robusta, lo que dio como resultado una diferenciación eficaz de células T e inmunidad sistémica tumoral. Esta eficacia superior dependía de la activación temprana de las células T CD4⁺ y se asociaba con una mayor razón de células CD4/CD8 intratumorales y memoria a largo plazo. En cambio, las células T-CAR administradas por vía intravenosa, incluso cuando se acumularon en números equivalentes en el tumor pleural, no lograron una activación, persistencia o erradicación tumoral comparables. La relevancia traslacional de estos hallazgos aumenta adicionalmente mediante el uso de células T humanas y CAR, ya que se utilizarán en estudios clínicos basándose en los resultados informados en el presente documento.

En este estudio, las células T-CAR dirigidas a MSLN se administraron por vía intra-pleural a ratones que portaban tumores pleurales establecidos (12-18 días después de la inoculación, los ratones de control mueren en el día 25-36). Usando la obtención de imágenes no invasiva de tumores y células T, se demostró que las células T-CAR administradas por vía intrapleural (1) se infiltran eficientemente en todo el tumor en el tórax, (2) se convierten en potentes células efectoras que erradican el tumor pleural a dosis 30 veces menores que las usadas en la terapia intravenosa, y (3) migran fuera de la cavidad pleural, circulan y se acumulan en sitios tumorales extratorácicos. Mientras que la ubicación inmediata de las células administradas de manera regional sorteaba la circulación obligatoria y el secuestro pulmonar transitorio de las células T administradas por vía intravenosa, las células T administradas por vía intrapleural diferían de las células T reclutadas de manera sistémica en 1) el nivel de acumulación de células T CD8 y 2) la rapidez de la cinética de diferenciación de efectores, tal como se refleja en la regulación por disminución de CD62L. La falta inicial de acumulación de células T CD8⁺ pleurales no está provocada por la desaparición general de las células T CD8⁺, ya que las células T CD8⁺ persistieron en el bazo de los ratones a lo largo de 7 días después de la administración intravenosa. Su escaso reclutamiento podría deberse en parte a la expresión subóptima del receptor de quimiocinas o las moléculas de adhesión requeridas para su tráfico. Sin embargo, a pesar de que la acumulación pleural puede mejorarse mediante la expresión forzada de CCR-2 transducido en células T-CAR⁵⁵, la terapia regional con células T-CAR sorteaba las restricciones de tráfico, si las hay, y permite, sin modificación por ingeniería adicional de células T, una redistribución altamente eficiente a otras ubicaciones tumorales con mayor eficacia que las células T administradas por vía intravenosa. Además, una única dosis de terapia regional con células T-CAR estableció inmunidad tumoral a largo plazo (hasta 200 días después de la administración de células T), proporcionando una protección eficaz frente a la reexposición al tumor.

Este beneficio sistémico de la terapia regional con células T-CAR recuerda el efecto abscopal de la radioterapia locoregional^{125,126} y terapia viral oncolítica intratumoral¹²⁷ para tumores malignos sólidos, en los que una respuesta inflamatoria local puede generar inmunidad específica y tener un impacto eficaz en sitios tumorales a distancia. Las células T-CAR administradas por vía intrapleural migran fuera de la cavidad pleural y se visualizan directamente en sitios de tumor extrapleural tan pronto como a las 24 a 72 h después de la administración. Por tanto, la activación temprana de las células T tiene un efecto beneficioso sobre la biodistribución de las células T-CAR. La rápida adquisición de un fenotipo CD62L⁻ puede explicar su eficiente tráfico posterior a sitios metastásicos¹²⁴. La extensa linfovascularidad del mesotelioma pleural⁸⁶ en el presente modelo ortotópico, que contrasta con el de los tumores en el flanco, que experimentan normalmente necrosis central con el crecimiento, puede contribuir a una activación y redistribución tan eficiente de las células T.

La notable capacidad de las células T administradas por vía intrapleural para circular y persistir dentro de la periferia abre nuevas vías de tratamiento para los cánceres metastásicos con sitios tumorales accesibles, que pueden servir como "centros regionales de carga y distribución" para la terapia con células T-CAR. Estos incluyen cánceres que metastatizan en la cavidad peritoneal, tales como cánceres de pulmón y de mama, así como los que metastatizan en la cavidad peritoneal, tales como cánceres de páncreas y de ovario. Además de la administración intrapleural o intraperitoneal, los presentes hallazgos plantean la posibilidad de que otros enfoques regionales de terapia adoptiva con células T, tales como la infusión de la arteria hepática, la perfusión regional de extremidades o la administración intracraneal¹²⁸⁻¹³⁰ pueden proporcionar una eficacia superior. De manera más conservadora, estos enfoques de administración regional y/o intratumoral son altamente aplicables a otros cánceres vendidos que expresan MSLN, que incluyen cáncer de ovario, de páncreas, colorrectal, de pulmón, de mama triple negativo, de esófago, gástrico, de colangio y tímico^{37,47,119,58,131-135}. Este enfoque puede, como mínimo, disminuir el requisito de dosis de células T, presentando una ventaja cuando no puede alcanzarse un alto número de células T-CAR (debido a aféresis de bajo rendimiento, escasa expansión *ex vivo* o baja transducción) e incluso pueden obviar la necesidad de aféresis

sistemática.

La infiltración y la activación temprana del subconjunto de células T CD4⁺ es esencial para los beneficios observados de la administración regional. Las células T-CAR M28z eran multifuncionales, presentando una potente citotoxicidad de células T CD4⁺, así como una función cooperadora que respalda la formación, supervivencia y proliferación de los efectores de células T. La doble funcionalidad de las células T CD4⁺ se demuestra más claramente por la capacidad de los efectores CD4⁺ para eliminar de manera independiente xenoinjertos de mesotelioma pleural tras la administración regional. Su función clave en la función cooperadora está respaldada por el subconjunto de células T CD8⁺ mejorado observado después de la administración pleural en comparación con la administración intravenosa y la importancia de las células T CD4⁺ activadas por antígeno de manera temprana para lograr un estallido proliferativo de células T CD8⁺. La menor capacidad de las células T administradas por vía intravenosa para lograr una potente acumulación de los subconjuntos CD4⁺ y CD8⁺ sugiere que las células T-CAR M28z se ven afectadas negativamente por su llegada retardada al sitio del tumor.

El papel crítico de la coestimulación de CD28 proporcionada a través del CAR se revela de varias maneras. Las células T M28z eliminaron grandes tumores pleurales incluso a dosis bajas de células T. Las dosis de células T intrapleurales que se usaron (3×10^5 células T M28z en la mayoría de los experimentos) es una dosis notablemente menor que la usada en otros estudios de xenoinjertos de mesotelioma^{55,56,123}, y es comparable a las dosis usadas en ensayos clínicos actuales para tumores malignos hematológicos^{11,116} y tumores sólidos^{136,137} (véase la tabla 2).

Tabla 2. Dosis de células T-CAR en estudios preclínicos y clínicos*.

Referencia	Tipo de estudio	Tumor	Vía de administración	Dosis de células T
Estudio actual	Preclínico	MPM ortotópico	Pleural	3×10^5 CAR ⁺
20	Preclínico	MPM en el flanco	Intravenosa, intraperitoneal e intratumoral	20×10^5 CAR ⁺
22	Preclínico	MPM en el flanco	Intravenosa	20×10^6 CAR ⁺
43*	Clínico	MPM	Intravenosa	$3,5 \times 10^6$ CAR ^{***}
42	Clínico	Glioblastoma	Intravenosa	8×10^5 CAR ⁺
9	Clínico	Leucemia linfoblástica aguda de células B	Intravenosa	7×10^5 CAR ⁺

* Este ensayo clínico usa electroporación de ARNm para expresar CAR. Otros estudios clínicos y preclínicos usan vectores o bien retrovirales (estudio actual^{11,136}) o bien lentivirales^{55,123} que transducen CAR.

** Dosis para ratón equivalentes a las dosis humanas usadas en ensayos clínicos calculadas usando fórmulas disponibles del Instituto Nacional del Cáncer (<http://dtp.nci.nih.gov>).

En comparación con las células T Mz, las células T M28z proporcionaron un control tumoral superior y una proliferación robusta tras reexposición al tumor > 100 días después de la administración intrapleural. Las propiedades potenciadoras de la señalización de CD28 son particularmente notables en el subconjunto CD4⁺, tal como lo demuestra su proliferación y secreción de citocinas superiores, en relación con las células T CD8⁺. Curiosamente, el CAR CD28/CD3 ξ fue esencial para inducir una citotoxicidad mediada por células T CD4⁺ eficiente por una ruta dependiente de perforina/granzima. Está bien establecido que las células T CD4⁺ requieren una interacción de mayor avidez para mediar en las funciones efectoras en comparación con las células T CD8⁺^{138,139}. La modificación por ingeniería del CAR CD28/CD3 ξ puede ser particularmente adecuada para generar células T CD4⁺ multifuncionales que sean capaces de ayudar a las células T y de citotoxicidad¹⁴⁰.

La localización y activación mejoradas de las células T-CAR dirigidas a mesotelina en la vecindad de tejidos normales que expresan niveles bajos de mesotelina pueden aumentar el riesgo hipotético de toxicidades "en la diana, fuera del tumor", tales como pleuritis y pericarditis. Sin embargo, la expresión de mesotelina es notablemente mayor en los tejidos tumorales en comparación con los tejidos normales, tal como se notificó previamente.^{47,91,119} Dado que la activación de las células T-CAR es más fuerte en presencia de una mayor densidad de antígeno, se espera que las células T-CAR respondan con mayor fuerza al tumor que al tejido normal. Esto está respaldado por los estudios *in vitro* de los inventores que usan una diana isogénica (figuras 46A y 46B) y otros^{54,140}. También es digno de mención que los estudios histopatológicos en ratones tratados con células T-CAR dirigidas a mesotelina no revelaron cambios inflamatorios en la pleura o el pericardio. Además, los estudios clínicos dirigidos a mesotelina con inmunotoxinas no han demostrado toxicidad en tejidos normales en más de 100 pacientes^{122,141,142}. La toxicidad notificada observada en un paciente tratado con células T-CAR dirigidas a mesotelina (un choque anafiláctico) se debió a una respuesta de anticuerpos al CAR, que comprende un scFv murino¹⁴³. El CAR M28z se compone sólo de secuencias humanas⁵³. No obstante, se creía que eran necesarias estrategias adicionales para limitar o prevenir la reactividad frente al tejido normal. Aunque los corticosteroides linfotóxicos a veces pueden eliminar las células T-CAR¹¹⁷, los inventores procederán a la clínica usando un gen suicida⁹⁴. Los genes suicidas tales como iCaspasa-9⁹⁴, mutación de EGFR¹⁴⁴ y timidina cinasa del virus del herpes simple¹⁴⁵ median en la eliminación rápida de células T después de la administración de un profármaco o anticuerpo. Los inventores también pueden aplicar, si es necesario, estrategias alternativas diseñadas para prevenir la reactividad frente a tejidos normales usando

reconocimiento de antígeno combinatorio o receptores inhibidores¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Otra estrategia para limitar la toxicidad de las células T-CAR es expresar de manera transitoria el CAR mediante electroporación de ARNm^{56,149}, aunque a expensas de la persistencia de células T-CAR y que requieren múltiples administraciones de células T para lograr la eficacia.

En este estudio, se usaron ratones inmunodeficientes con células cancerosas humanas y células T humanas para facilitar la traducción clínica directa de los presentes hallazgos y los vectores CAR de base humana a ensayos clínicos, tal como se hizo previamente para las terapias con células T-CAR dirigidas a CD19 y PSMA^{15,16,117}. Las interacciones entre las células transferidas manera adoptiva y el sistema inmunitario endógeno investigado en un modelo de ratón inmunocompetente ampliarán la significación de las presentes observaciones.

Basándose en los datos presentados en el presente documento, se diseñó un ensayo clínico de fase I para evaluar la seguridad de la administración intrapleural de células T-CAR dirigidas a MSLN. Se incluirán en este ensayo pacientes con tumor maligno pleural primario o tumores malignos pleurales secundarios de cánceres de pulmón y de mama que sobreexpresan MSLN, que los inventores han demostrado que tienen una enfermedad más agresiva^{91,119}, se inscribirá. Las células T-CAR dirigidas a MSLN se administrarán a través de catéteres intrapleurales, un enfoque desarrollado para ser el método de referencia en el manejo de pacientes con derrames pleurales malignos¹⁵⁰. La administración regional de agentes biológicos tales como citocinas¹⁵¹ y virus oncolítico¹⁵² se ha traducido previamente a la clínica con éxito. Este estudio respalda firmemente que la administración regional de células T-CAR a sujetos con MPM dará como resultado una mayor potencia antitumoral de las células T con dosis reducidas de células T, debido en parte a la activación temprana de las células T CD4⁺ y los beneficios sistémicos que se derivan.

Ejemplo 8 - Las células T-CAR resisten la inhibición mediada por tumores

1. RESUMEN

Usando un modelo ortotópico de ratón clínicamente relevante de mesotelioma pleural, los inventores demuestran que los CAR basados en células T que expresan CD28 o 4-1BB de segunda generación, aunque persistentes, se inhiben funcionalmente dentro del microentorno tumoral. Mientras que los CAR de CD28 y 4-1BB confieren una proliferación y persistencia similar de las células T-CAR; estos últimos conservaron de manera más duradera sus funciones citotóxicas y de secreción de citocinas, lo que dio como resultado una mejor supervivencia en ratones que recibieron dosis bajas de células T.

2. INTRODUCCIÓN

Los receptores de antígeno quimérico (CAR) son receptores sintéticos que redireccionan las células T a los antígenos de la superficie tumoral^{157,158}. Los receptores de primera generación ligan un elemento de unión tumoral derivado de anticuerpos que es responsable del reconocimiento de antígeno a dominios de señalización de receptor o bien CD3zeta o bien Fc, que desencadenan la activación de las células T. El advenimiento de los CAR de segunda generación, que combinan dominios de señalización activadores y coestimuladores, ha conducido a resultados alentadores en pacientes con tumores malignos de células B resistentes a quimioterapia¹⁵⁹⁻¹⁶³. La traducción de este éxito clínico a tumores sólidos, que aún no se ha logrado, requerirá superar obstáculos adicionales, incluyendo lograr una infiltración suficiente de células T en los tumores y resistir el escape inmunitario del tumor. Para superar las limitaciones de la infiltración tumoral y la activación retardada observada con la administración sistémica de células T, los inventores demostraron recientemente los beneficios de la administración regional de células T-CAR específicas de mesotelina en un modelo clínicamente relevante de mesotelioma pleural¹⁶⁴. La mesotelina (MSLN) es un antígeno de superficie celular asociado a tumor, que se seleccionó basándose en su sobreexpresión en varios tipos de cáncer y las observaciones de los inventores de su asociación con la agresividad del tumor y la supervivencia disminuida en pacientes con mesotelioma, cáncer de pulmón y de mama¹⁶⁵⁻¹⁷². La administración regional de las células T-CAR dirigidas a MSLN erradica el tumor primario y establece la inmunovigilancia sistémica a largo plazo a dosis 30 veces menores que la administración intravenosa¹⁶⁴. Estos resultados son alentadores para el tratamiento de tumores malignos sólidos y propiciaron que los inventores iniciaran un ensayo clínico de fase I de la administración intrapleural de células T-CAR dirigidas a mesotelina (NCT02414269). A medida que los inventores modelaron la infiltración tumoral de bajo nivel, descubrieron y notifican en el presente documento que las células T-CAR pueden ser susceptibles a la inhibición inmunitaria mediada por células tumorales, lo que da como resultado una función alterada de las células T y un rechazo disminuido del tumor.

En este informe, los inventores han establecido la presencia y la cinética de la inhibición mediada por tumor de las células T-CAR. Al realizar un análisis en serie exhaustivo de las funciones efectoras de las células T, los inventores han establecido que incluso las células T-CAR coestimuladas actualmente en ensayos clínicos están sujetas a la inhibición de sus funciones de citolíticas y secreción de citocinas al encontrarse con el antígeno de manera repetida *in vivo*. Las diferentes capacidades de las estrategias coestimuladoras alternativas (4-1BB frente a CD28) para resistir la inmunoinhibición se destacaron adicionalmente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Propósito general

El propósito de este estudio fue caracterizar los mecanismos de inhibición de células T mediada por tumor, para mejorar la eficacia de la inmunoterapia con células T para tumores malignos sólidos. Los inventores diseñaron CAR dirigidos a MSLN que, cuando se transducen en células T humanas, proporcionan reconocimiento de antígeno tumoral y activación de función efectora específica de antígeno. Los inventores también diseñaron dominios de señalización que proporcionan señalización coestimuladora y/o bloqueo coinhibidor. *In vitro*, se analizaron la citotoxicidad, la secreción de citocinas y la proliferación de células T. Los experimentos *in vivo* analizaron estrategias para optimizar la terapia con células T, mediante el uso de modelos de ratón clínicamente relevantes de MPM ortotópico y cáncer de pulmón metastásico. Se usaron células cancerosas humanas y células T humanas para validar y facilitar la traducción del presente CAR M28z a la clínica, tal como se demostró previamente para células T-CAR CD19²¹⁴ y PSMA²¹⁵. Los procedimientos experimentales los aprobó el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC). Cada experimento se realizó varias veces, usando células T de donantes diferentes. Para evitar variables de confusión, tales como las diferencias debidas a las eficiencias de transducción, la variabilidad relacionada con el donante y las razones E:D, los datos presentados en el presente documento usan un experimento representativo, con réplicas de muestras de más de 3.

Líneas celulares

Se transdujeron células de mesotelioma pleural humano MSTO-211H (ATCC, Manassas, VA) de manera retroviral para expresar GFP y la proteína de fusión de luciferasa de luciérnaga (MSTO GFP-ffLuc⁺). Estas células se transdujeron entonces con la variante 1 de MSLN humana subclonada en un vector retroviral SFG para generar MSTO MSLN⁺ GFP-ffLuc⁺. De manera similar, se transdujeron células A549 y fibroblastos murinos 3T3 con la variante 1 de MSLN humana sola para generar las líneas celulares A549 MSLN⁺ y 3T3MSLN⁺. Las células 3T3 también se cotransdujeron con PD-L1 (ADNc de Orígene subclonado en el vector SFG) para generar células 3T3 MSLN⁺ PDL1⁺.

Construcción de vectores γ -retrovirales y producción viral

Para generar CAR específicos de MSLN, los inventores diseñaron un ADNc que codifica para un scFv m912 completamente humano específico para MSLN (proporcionado por D. Dimitrov, Instituto Nacional del Cáncer en Frederick)¹⁸⁶, ligado al dominio líder de CD8 humano y al dominio CD8/CD3 ξ , CD28/CD3 ξ o CD8/4-1BB/CD3 ξ , tal como se describió anteriormente²¹⁶. El CAR específico de PSMA de control se generó de manera similar, usando un scFv de direccionamiento a PSMA previamente caracterizado²¹⁵. La secuencia de CAR se insertó en el vector γ -retroviral SFG (proporcionado por I. Riviere, MSKCC) y se ligó a una secuencia de P2A para inducir la coexpresión del indicador LNGFR (receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad truncado). Se transfectaron luego plásmidos que codifican para CAR en líneas celulares de empaquetamiento 293T H29 para producir el retrovirus, tal como se describió previamente²¹⁹.

Aislamiento de células T, transferencia génica y aislamiento de CD4/CD8

Se aislaron leucocitos de sangre periférica de la sangre de donantes voluntarios sanos con un protocolo aprobado por la junta de revisión institucional. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de baja densidad en Lymphoprep (Stem Cell Technology, Vancouver, Canadá) y se activaron con fitohemaglutinina (2 ug/ml; Remel, Lenexa, KS). Dos días después del aislamiento, se transdujeron las PBMC con partículas retrovirales producidas por 293T RD114 que codifican para CAR y se sometieron a espinoculación durante 1 hora a 3000 rpm en placas recubiertas con retronectina (15 μ g/ml; r-fibronectina, Takara, Tokio, Japón). Después de 1 día, se mantuvieron las PBMC transducidas en IL-2 (20 UI/ml; Novartis, Basilea, Suiza). Se determinaron las eficiencias de transducción mediante análisis por citometría de flujo. Se obtuvieron poblaciones puras de células T CD4CAR⁺ y CD8⁺, mediante clasificación basada en citometría de flujo (BD Aria Sorter).

Citometría de flujo

Se detectó la expresión de MSLN humana usando una IgG2a de rata anti-MSLN humana conjugada con ficoeritrina o alofococianina (R&D Systems, Minneapolis, MN). La expresión de proteínas coestimuladoras o inhibidoras en células tumorales se analizó usando los siguientes anticuerpos: 4-1BBL (PE, clon 5F4; BioLegend, San Diego, CA), MHC HLA-DR (PE, clon L203; R&D Systems), PD-L1 (APC, clon MIH1; eBioscience, San Diego, CA), PD-L2 (APC, clon MIH18; eBioscience) y galectina-9 (APC, clon 9M13; BioLegend). Se determinaron el fenotipo de células T y la eficiencia de transducción con anticuerpos monoclonales para CD3, CD4, CD8 y CD69m LNGFR. La expresión de receptores inhibidores de células T se analizó usando PD1 (APC, eBioJIU5; eBioscience), TIM-3 (PE, clon 344823; R&D Systems) y Lag-3 (PE, clon C9B7W; BioLegend). La tinción celular se analizó usando un citómetro de flujo BD LSRII (BD, Franklin Lakes, NJ) y el software de análisis FlowJo.

Ensayos funcionales de células T

Se determinó la citotoxicidad de las células T transducidas con un control vector o CAR mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr convencionales, tal como se describió previamente²²⁰. Para realizar el ensayo de actividad luciferasa, se incubaron células T-CAR⁺ y células MSTO-211H que expresan MSLN y luciferasa de luciérnaga durante 18 h a diferentes razones E:D. La cantidad de células tumorales se determinó mediante BLI usando IVIS 100/lumina II, después de la adición de 100 μ l de D-luciferina (15 mg/ml) por pocillo, y se comparó con la señal

emitida por las células tumorales solas. Se realizó tinción de CD107a e intracelular después de la incubación de las células efectoras y las células tumorales MSTO-211H MSLN irradiadas, durante 18 h en placas de 24 pocillos en una razón de 5:1. Para el ensayo de CD107a, se añadieron 5 μ l de anticuerpo CD107a-PeCy7 (BD Biosciences, San José, CA) y Golgi STOP (4 μ l/6 ml; BD Biosciences) en el momento de la estimulación. Para la tinción intracelular, se añadió Golgi Plug (1 μ l/1 ml; BD Biosciences) en el momento de la estimulación. Después de la incubación, las células efectoras se tiñeron para marcador CD4, CD8, LNGFR y CD3, luego se fijaron y se permeabilizaron según las instrucciones del fabricante (kit Cytotfix/Cytoperm; BD Biosciences). La tinción de las citocinas intracelulares se realizó usando granzima B-APC, perforina-PE y anticuerpos IFN- γ -FITC (BD Biosciences).

Se realizaron ensayos de liberación de citocinas mediante el cocultivo de 3×10^4 a 5×10^3 células T con células diana en una razón de 1:1 a 5:1, en 200 μ l de medio, en placas de fondo redondo de 96 pocillos como triplicados. Después de 6 a 24 h de cocultivo, se recogieron los sobrenadantes. Se determinaron los niveles de citocinas usando un kit de detección de citocinas humanas con perlas multiplex, según las instrucciones del fabricante (Millipore, Darmstadt, Alemania).

Para analizar la capacidad de proliferación de las células T, se estimularon 1×10^6 células T CAR⁺ sobre células MSTO-211H o 3T3 irradiadas con o sin expresión de MSLN (y, en el caso de 3T3, con o sin PD-L1). Los ensayos de proliferación se realizaron en ausencia de IL-2 exógena. Se contaron las células cada 7 días y luego se superpusieron sobre células diana irradiadas para estimulaciones repetidas. Se representó gráficamente el número de células T CAR⁺ frente al tiempo para cada grupo de células T.

Modelo animal de mesotelioma pleural ortotópico y experimentos ex vivo

Para desarrollar el modelo ortotópico de ratón de mesotelioma pleural, se usaron ratones hembra NOD/SCID γ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) de 4 a 6 semanas de edad. Se realizaron todos los procedimientos con protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y oxígeno inhalados, con bupivacaína administrada para la analgesia. Se realizó la inyección intrapleural directa de 1×10^5 a 1×10^6 células tumorales en 200 μ l de medio libre de suero a través de una incisión en la parte derecha del tórax para establecer tumores MPM ortotópicos, tal como se describió previamente^{164,171,188}. En total, se transfirieron de manera adoptiva de 3×10^4 a 1×10^5 células T transducidas (en 200 μ l de medio libre de suero) a ratones portadores de tumor, o bien de en la cavidad torácica mediante inyección intrapleural directa o bien de manera sistémica mediante inyección en la vena de la cola. Se monitorizó y cuantificó el crecimiento tumoral *in vivo* mediante BLI realizada 20 min después de una única dosis intraperitoneal de D-luciferina (150 mg/kg; Perkin Elmer, Waltham, MA). Se analizaron los datos de IBL con el software Living Image (versión 2.60); se notificó la señal de BLI como flujo total (fotones por segundo), que representa el promedio del flujo ventral y dorsal. Para analizar la capacidad funcional de las células T-CAR *ex vivo*, se procesaron tejidos tumorales y el bazo de ratón de la siguiente manera: se pesaron los tejidos y se recogieron en RPMI 1640 enfriado con hielo. Se sometieron a morselizado los tejidos manualmente con un bisturí y luego se desagregaron mecánicamente a través de filtros de 40 a 100 μ m. A continuación, se analizaron las muestras mediante FACS para el fenotipado, o se clasificaron las células T-CAR⁺ CD4⁺ o CD8⁺ usando un clasificador FACS Aria y luego se dejaron en reposo durante 24 h en RPMI con IL-2 (60 UI/ml), y se realizaron ensayos de liberación de ⁵¹Cr y liberación de citocinas tal como se describió anteriormente.

Análisis histológico e inmunotinción

Se realizó la evaluación histopatológica de los tumores tras tinción con H&E de muestras de tejido fijadas con paraformaldehído al 4% incrustadas en parafina. El análisis inmunohistoquímico para MSLN humana se realizó con inmunoglobulina G de ratón anti-MSLN humana, tal como se describió previamente^{168,170,172}.

PCR cuantitativa en tiempo real

Se extrajeron los ARNm de las células T clasificadas CD4⁺ LNGFR⁺ o CD8⁺ LNGFR⁺ y se sometieron a transcripción inversa para dar ADNc usando el kit de ADNc μ MACS One-Step (MACS molecular, Miltenyi Biotech Inc, Auburn, EE.UU.). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) con el método Taqman® usando los sistemas Applied Biosystems® 7500 (Foster, CA, EE.UU.), Taqman® Universal PCR Mastermix y sondas Taqman® marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM-MBG) y diseñadas por Life technologies: Tbet (Hs00203436_m1); Eomes (Hs00172872_m1); granzima B (Hs01554355_m1); IFN γ (Hs00989291_m1); IL-2 (Hs00174114_m1); PD-1 (Hs01550088_m1). Se usó el ciclo umbral comparativo (C_T) del gen de interés y se normalizó con respecto al gen de mantenimiento β 2m usando la siguiente fórmula ΔC_t (muestra) = C_T (gen de interés) - C_T (β 2m). Entonces, se usó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para analizar la expresión de cambio en veces relativo en comparación con la condición de control y se calculó de la siguiente manera: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta C_t \text{ (muestra)} - \Delta C_t \text{ (control)})}$.

Métodos estadísticos

Se analizaron los datos usando el software Prism (versión 6.0; GraphPad Software, La Jolla, CA) y se presentan como media $\pm$ E.E.M., tal como se indica en las leyendas de las figuras. Se analizaron los datos usando la prueba t

de Student de datos independientes (bilateral), usándose la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, cuando se aplicable. Se analizaron las curvas de supervivencia mediante la prueba de rangos logarítmicos. La significación estadística se definió como $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism.

4. RESULTADOS

5 Los CAR con coestimulación de CD28 o 4-1BB muestran una proliferación y secreción de citocinas efectoras equivalentes *in vitro* tras la estimulación de antígeno inicial

Se construyeron tres CAR que incorporaron un scfv humano específico de MSLN¹⁸⁶ y cualquiera de los dominios de señalización CD3 ξ , CD28/CD3 ξ o 4-1BB/CD3 ξ (Mz, M28z, MBBz) (figuras 47A y 47B). El CAR P28z, que es específico para el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), sirvió como efector negativo para controlar la alorreactividad y la xenorreactividad. Se transdujeron eficazmente linfocitos T de sangre periférica humana CD4⁺ y CD8⁺ usando el vector retroviral SFG (transducción del 50% -70%) (figura 54). Las células MSTO-211H transducidas con MSLN (MSLN⁺) y las células de linfoma de ratón EL-4 transducidas con PSMA (MSLN⁻) sirvieron como dianas positivas y negativas para MSLN en los experimentos *in vitro*. Las células T transducidas con Mz, M28z y MBBz demostraron una lisis específica de MSLN similar *in vitro* (figura 47C). Las células T-CAR P28z no lisaron las células MSTO MSLN⁺, y los CAR dirigidas a MSLN no lisaron las células EL4 PSMA⁺, lo que demuestra que la lisis es específica de antígeno. Para validar la funcionalidad de la señalización coestimuladora¹⁸⁷, las células T-CAR M28z y MBBz secretaron niveles de citocinas Th1 de 2 a 15 veces mayores (figura 47D) y lograron una acumulación de células T 14 veces mayor tras la exposición repetida a células MSLN⁺ en comparación con Mz en ausencia de IL-2 exógena (figura 47E). Una vez establecida la especificidad de antígeno y validado la funcionalidad de los dominios de señalización coestimuladores, se procedió a evaluar el potencial terapéutico de las células T-CAR dirigidas a MSLN en ratones que portaban tumores pleurales establecidos.

M28z es más propenso a permitir la recidiva tumoral que MBBz

En un modelo ortotópico de mesotelioma pleural maligno (MPM) previamente establecido por el laboratorio de los inventores^{171,188-190}, se usó la obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) en serie con células MSTO-211H transducidas con luciferasa de luciérnaga (ffLuc) para confirmar el establecimiento del tumor, para igualar la carga tumoral entre los grupos de intervención antes del inicio de la terapia con células T y para medir la respuesta a la terapia. Tanto las células T-CAR M28z como las MBBz administradas por vía intrapleural en una única dosis de 1×10^5 (razón de efector con respecto a diana [E:D] de 1:3000, estimada a partir de la cuantificación de la carga tumoral)¹⁸⁹ pudieron erradicar tumores pleurales establecidos en la mayoría de los ratones (figura 48A, parte superior). Dado que el objetivo en este estudio fue investigar el efecto de la inmunoinhibición inducida por tumor sobre el agotamiento de células T, se administraron células T-CAR a ratones que portaban tumores pleurales establecidos a dosis sucesivamente menores. Se planteó la hipótesis de que a estas dosis menores, las células T serían especialmente susceptibles al agotamiento, ya que deben conservar la función en los encuentros repetidos con antígenos dentro de un entorno inhibitorio para eliminar el tumor. Es a estas dosis menores cuando los inventores comenzaron a ver la recidiva tumoral, especialmente dentro de la cohorte de M28z (figura 48A, parte intermedia e inferior). A la menor dosis sometida a prueba de 4×10^4 (E:D, 1:7.500), ratones tratados con Mz intrapleural (CAR de 1ª generación, sin señalización coestimuladora incluida) las células T-CAR mostraron una respuesta insostenible en términos de carga tumoral (figura 48B), y la mediana de supervivencia fue 29 días más larga que la de los controles tratados con P28z (mediana de supervivencia, 45 días frente a 16, P28z representa un control de xenorreactividad y alorreactividad de direccionamiento al antígeno PSMA) (figura 48B). Los ratones tratados con células T-CAR M28z tuvieron una reducción más uniforme de la carga tumoral y sobrevivieron más tiempo (mediana de supervivencia, 64 días) que los ratones tratados con células T-CAR de primera generación; sin embargo, todos los ratones tratados con células T-CAR M28z murieron eventualmente por la progresión del tumor. Se confirmó que el crecimiento tumoral no estuvo provocado por el escape de antígeno tumoral (se encontró que los tumores recurrentes en todos los ratones analizados eran MSLN⁺ mediante análisis por citometría de flujo e histológico; datos no mostrados). En cambio, las células T-CAR MBBz administradas por vía intrapleural indujeron la erradicación tumoral en el plazo de 20 días de tratamiento, y la gran mayoría de los ratones (7 de 8) permanecieron libres de tumor durante > 100 días (la mediana de supervivencia no se alcanzó en el día 100).

MBBz supera a las células T- CAR M28z en dosis bajas de células T

Las mejoras en la eficacia de las células T-CAR que ofrece la señalización coestimuladora se atribuyen normalmente a mejoras en la proliferación y/o persistencia de células T-CAR¹⁵⁸. Como era de esperar, las células T-CAR M28z y MBBz lograron una acumulación mejorada de células T intratumorales, en comparación con las células T-CAR Mz (9 veces mayor para M28z, 12 veces mayor para MBBz) (figura 49A). Sorprendentemente, a pesar de las diferencias de eficacia entre las células T-CAR M28z y MBBz, se observaron números similares de células T infiltrantes de tumor entre los dos grupos (figura 49A). Además, las células T-CAR M28z y MBBz fueron igualmente persistentes en puntos de tiempo a largo plazo (figura 49B). El tejido tumoral y bazo de ratones tratados con M28z que inicialmente tuvieron una respuesta al tratamiento, pero luego murieron por la progresión del tumor contenían células T circulantes así como células T infiltrantes de tumor, incluyendo células positivas para CAR (figura 49C). Este hallazgo demuestra que la mera persistencia de células T que pueden transitar eficazmente al tumor no es suficiente para eliminar el tumor y que el estado funcional de las células T dentro del microentorno tumoral puede ser

el determinante más crítico del desenlace clínico. Por tanto, se planteó la hipótesis de que incluso las células T coestimuladas pueden llegar a agotarse dentro del tumor, especialmente a dosis bajas de células T que corresponden a bajas razones efector:diana. Además, las células T-CAR MBBz, que eran tan persistentes como las células T-CAR M28z, pueden resistir mejor el agotamiento y retener la función efectora de las células T para eliminar una gran carga tumoral.

Las células T-CAR de mesotelina se agotan después de la exposición al antígeno in vivo

Para evaluar si hay una inmunoinhibición continuada de las células T-CAR y comparar las capacidades relativas de las células T-CAR M28z y MBBz para superar la inmunoinhibición mediada por tumor, se inyectaron 1×10^6 células T-CAR en las cavidades pleurales de ratones portadores de tumor MSLN⁺, se les dio tiempo suficiente para el encuentro repetido con el antígeno y la activación de las células T (confirmado mediante dispersión frontal y lateral y la regulación por incremento del marcador de activación CD69), y luego se realizó estimulación *ex vivo* de células T-CAR CD4 o CD8 esplénicas o infiltrantes de tumor recogidas con dianas MSLN⁺ (se muestra esquemáticamente en la figura 50A). Se usaron células T en reposo *in vitro* no inyectadas ("células de preinfusión") para establecer el nivel inicial de función (antes de la exposición al antígeno). En comparación con células T-CAR M28z CD8⁺ en reposo, las células T expuestas al antígeno MSLN *in vivo* tenían menores niveles de función citolítica (figura 50A) (lisis de células de preinfusión, 20,5%; lisis de células T infiltrantes de tumor, 13,1%; lisis de células T esplénicas, 8,7%). En cambio, las células T-CAR MBBz conservaron la función citolítica (lisis de células de preinfusión, 18,3%; lisis de células T infiltrantes de tumor, 37,2%; lisis de células T esplénicas, 22,2%). Las células T-CAR CD4⁺ clasificadas demostraron un patrón de resultados similar. También se midieron los niveles de citocinas tras la estimulación *ex vivo* de las células T-CAR infiltrantes de tumor y esplénicas y también se observó una disminución de la secreción de citocinas Th1 para las células T-CAR T M28z CD4⁺ expuestas *in vivo* al antígeno MSLN⁺. Las células T-CAR MBBz CD4⁺ también demostraron una disminución de la secreción de citocinas Th1, aunque estas células pudieron retener mejor la secreción de citocinas en comparación con las células T-CAR M28z (figura 50B). Los sobrenadantes de células T CD8⁺ contenían niveles significativamente menores de citocinas, en comparación con los sobrenadantes de células T CD4⁺ (un hallazgo observado previamente en este modelo¹⁶⁴). Las células T CD8⁺ también tenían una capacidad disminuida para secretar citocinas tras exposición a antígeno *in vivo*; las células T-CAR MBBz CD8⁺ conservaron preferentemente su capacidad de secretar IFN- γ . A continuación, se evaluaron los niveles de ARNm de las células T extraídas del tumor y el bazo en el día 3 después de la administración, y se descubrió que los niveles de expresión *in vivo* de GzB, IL-2 e IFN- γ fueron en gran parte mayores para las células T-CAR MBBz CD4⁺ y CD8⁺ que para las células T-CAR M28z, con la excepción de la expresión de IL-2 en el subconjunto CD8⁺ (figura 50C).

Las células T-CAR MBBz muestran agotamiento retardado in vivo

Habiéndose demostrado la inhibición tanto de la función citolítica como de la secreción de citocinas efectoras en las células T-CAR coestimuladas expuestas al antígeno *in vivo*, los inventores razonaron que la estimulación de antígeno repetida puede, de manera similar a los modelos de infección crónica, desempeñar un papel en la inhibición de las células T y que las diferentes capacidades para retener la función en el encuentro repetido con el antígeno podrían explicar una eficacia mejorada de las células T-CAR MBBz. Por tanto, las células T-CAR Mz, M28z y MBBz se analizaron para determinar su capacidad de resistir el encuentro con antígeno repetidos en un sistema modelo *in vitro*, en el que se evaluó la proliferación, la función citolítica y la secreción de citocinas en las células tras la estimulación con antígeno MSLN⁺ cada 7 días. Las células T-CAR M28z y MBBz tenían capacidades similares para expandirse tras la estimulación de MSLN⁺ en serie, expandiéndose hasta niveles 14 veces mayores que los de las células T-CAR Mz; perdieron la capacidad de expandirse tras la tercera estimulación (figura 51). Las células T-CAR MBBz y M28z perdieron la función citolítica tras la estimulación de antígeno repetida, aunque las células T-CAR MBBz fueron más capaces de retener la función lítica. Mientras que la lisis era igual entre los tres grupos de células T en la primera estimulación, en la tercera estimulación, la función lítica de M28z se inhibió hasta un nivel más pronunciado, de modo que las células T-CAR MBBz tenían una lisis tumoral mejorada en múltiples razones E:D (figura 51B, parte derecha). La función lítica (evaluada mediante un ensayo de desgranulación que mide la expresión de CD107a) en la tercera estimulación se correlacionó con los resultados de los ensayos de liberación de cromo (figura 51C). A continuación, se midió la secreción de citocinas Th1, y de nuevo, se observaron niveles similares entre las células T-CAR M28z y MBBz en la primera estimulación, así como una disminución sucesiva con cada estimulación. Al igual que con la citotoxicidad, las células T-CAR MBBz retenían preferentemente la secreción de citocinas; las concentraciones de citocinas disminuyeron > 30 veces para las células T-CAR M28z y sólo alrededor de 2 veces para las MBBz, cuando se compararon los niveles en las estimulaciones primera y segunda (figura 51D). Luego se confirmaron las diferencias en la producción de citocinas midiendo los niveles intracelulares de citocinas en la segunda estimulación (datos no mostrados). El análisis mediante PCR-transcriptasa inversa de las células T-CAR en el momento de la estimulación de antígeno reveló que las células T-CAR MBBz expresaban marcadores que se correlacionaban con menores niveles de agotamiento e inhibición, en comparación con las células T-CAR M28z: las células T-CAR MBBz expresaban mayores niveles de Tbet y eomesodermina y menores niveles de PD1 y FoxP3 (figura 55). Los inventores trataron de someter a prueba la función *in vivo* de las células T-CAR persistentes que ya se habían expuesto al antígeno tumoral, planteando la hipótesis de que, aunque la persistencia cuantitativa es igual entre las células T-CAR M28z y MBBz, las células T-CAR MBBz demostrarían una función mejorada tras la reexposición al tumor. A los ratones que portaban tumores pleurales MSLN⁺ establecidos se les administraron células T-CAR M28z o MBBz intrapleurales (a una dosis de 1×10^5 , razón E:D 1:3000) para erradicar el tumor

pleural (figura 51E). Veinte días después de la inyección inicial de células T, se realizó una reexposición al tumor inyectando células tumorales MSLN⁺ (1×10^6) en la cavidad pleural de los supervivientes; se monitorizó la carga tumoral usando BLI. Las células T-CAR MBBz persistentes fueron más capaces de controlar la carga tumoral (4 de 4 ratones tratados con MBBz tenían una señal de BLI a niveles iniciales frente a 2 de 4 ratones tratados con M28z) (figura 51E).

La célula tumoral PD-L1 inhibe las funciones efectoras de las células T-CAR de mesotelina

Habiéndose establecido que las células T-CAR se inhibían por el entorno tumoral *in vivo* y que las células T-CAR MBBz T eran más capaces de superar esta inhibición, debido al menos en parte a su capacidad para retener la función en encuentros con antígeno repetidos, los inventores trataron de evaluar el papel que desempeñan las rutas del receptor inhibidor y el ligando en el modelo. Los inventores comenzaron por la tinción de células T infiltrantes de tumor, en ratones tratados con M28z con progresión tumoral, para la expresión de rutas de inhibición bien conocidas. Se hallaron altos niveles de expresión de PD-1, Tim-3 y LAG-3 (figura 52A). Las células T-CAR MBBz infiltrantes de tumor recogidas 6 días después de la administración también demostraron una regulación por incremento de los receptores inhibidores, aunque expresaron niveles significativamente menores de receptor PD-1 tanto en el nivel de proteína como de ARNm (figuras 52B-52D). Las células T CD4⁺ expresaron mayores niveles de PD-1, en comparación con las células T CD8⁺. Se observó que una fracción significativa de las células T-CAR tanto M28z como MBBz coexpresa PD-1 y LAG-3 o PD-1 y Tim-3, lo que sugiere que múltiples rutas inhibidoras podrían estar funcionando simultáneamente (figura 56). A continuación, se evaluaron ligandos expresados en tumores: PD-L1 y PD-L2 (ligandos para PD-1), galectina-9 (ligando para Tim-3) y CMH de clase II (ligando para LAG-3). Sólo los ligandos de PD-1 se expresaron en células tumorales pleurales recogidas después de la administración intrapleural de células T-CAR M28z (figura 52E). Tal como se informó en otra parte^{173,174}, el cocultivo de células tumorales con IFN- γ y TNF- α (a concentraciones similares a las secretadas por las células T en las figuras 47 y 51) dio como resultado un nivel similar de regulación por incremento de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células tumorales (figura 52F), que refleja una adaptación de las células tumorales para resistir el ataque inmunitario ("inmunorresistencia adaptativa"). La presencia única de expresión tanto del receptor PD-1 como del ligando *in vivo* sugiere que esta ruta puede desempeñar un papel inhibidor significativo. Como algunos estudios han sugerido que la coestimulación puede ser suficiente para superar la inhibición por PD-1¹⁹¹⁻¹⁹³, los inventores evaluaron luego si PD-L1 sobreexpresado puede inhibir la función de las células T-CAR en un modelo *in vitro* de inmunoinhibición mediada por PD-L1 (usando fibroblastos de ratón 3T3 transducidos con MSLN sola [MSLN⁺] o MSLN y PD-L1 [MSLN⁺ PD-L1⁺]) (figura 53A). Tanto en las células T-CAR M28z como en las MBBz, la sobreexpresión de PD-L1 provocó una disminución de la acumulación tras la estimulación sucesiva (figura 53B) y la secreción de citocinas efectoras Th1 (figura 53D). Aunque la lisis de las células tumorales no se inhibió tras la estimulación inicial (datos no mostrados), el ensayo de liberación de cromo realizado con 3T3 como dianas tras dos estimulaciones frente a células tumorales MSTO MSLN⁺ demuestra una disminución de la función lítica tanto en las células T-CAR M28z como en las MBBz, un mayor grado de disminución en las células T-CAR M28z (figura 53C). Este resultado puede deberse a la regulación por incremento diferencial de PD-1 en las células T-CAR M28z y MBBz después de la exposición a células tumorales MSTO MSLN⁺.

5. DISCUSIÓN

El estudio presentado en el presente documento demuestra que incluso las células T que expresan CAR de segunda generación se inhiben tras la exposición a antígeno *in vivo* dentro del microentorno tumoral. El que varios otros estudios notifiquen que la coestimulación sola puede superar la señalización inhibidora expresada en tumor puede explicarse por su dependencia de estudios *in vitro*, su uso de modelos inmunosensibles *in vivo* y su administración de altas dosis de células T que no reflejan las cargas de los tumores sólidos establecidos observadas en pacientes¹⁹¹⁻¹⁹³. En los experimentos, las mayores dosis de células T dan como resultado la erradicación tumoral independientemente de un dominio coestimulador CD28 o 4-1BB. Es a las dosis menores de células T (y a las menores razones efector:diana resultantes) donde se hace evidente el efecto del agotamiento. Estos hallazgos ilustran la importancia de usar modelos *in vivo* clínicamente relevantes y dosis de células T que son similares a las usadas en ensayos con pacientes. Las dosis de células T intrapleurales usadas (de 4×10^4 a 1×10^5 por ratón equivalente a de $1,2 \times 10^5$ a 3×10^6 /kg en seres humanos) son dosis marcadamente menores que las usadas en otros estudios de xenoinjertos de mesotelioma^{194,195} y son comparables a las usadas en ensayos clínicos actuales para tumores malignos hematológicos^{159,162} y tumores sólidos^{196,197}. Por tanto, la estrategia experimental presentada en el presente documento es particularmente adecuada para caracterizar el papel del agotamiento en la terapia con células T-CAR.

En este informe, aunque tanto la señalización coestimuladora de 4-1BB como la de CD28 aumentaron la persistencia de células T en un grado similar con menores razones E:D, sólo el tratamiento con células T coestimuladas con 4-1BB erradicó el tumor. Las células T coestimuladas con 4-1BB, aunque todavía sensibles a la inhibición mediada por tumor, fueron relativamente resistentes a la disminución de la función citolítica y la secreción de citocinas de las células T, ambas después de exposición a antígeno *in vivo* y con estimulación de antígeno repetida *in vitro*. La resistencia de la señalización de 4-1BB a la inmunoinhibición está asociada con un fenotipo más potente (PD-1^{lo}Tbet^{hi}Eomesodermina^{hi})¹⁹⁸⁻²⁰², que se ha relacionado con un menor agotamiento y una respuesta efectora citotóxica más robusta en otros modelos tumorales y el modelo análogo de infección viral crónica. Esto sugiere que los criterios para seleccionar una estrategia de señalización coestimuladora particular entre las opciones

disponibles (es decir, 4-1BB, CD28, OX40L, 4-1BBL, CD27, etc.) deberían extenderse más allá de la persistencia de células T a “persistencia funcional”, que se define como la capacidad de las células T para funcionar tras la estimulación de antígeno repetida, o bien inicialmente dentro del microentorno tumoral o bien como puede suceder tras la reexposición a antígeno después del control de la carga tumoral primaria. Al igual que con el trabajo ya publicado de los inventores que respalda la terapia regional con células T-CAR,¹⁶⁴ la administración de células T con alta persistencia funcional permite administraciones únicas de dosis bajas de células T que pueden servir para limitar los síndromes de liberación de citocinas y todavía erradicar el tumor primario. Es importante tener en cuenta que no debe concluirse a partir de estos experimentos que 4-1BB es el agente de coestimulación *de facto* que se usará para la terapia del paciente: la ruta de señalización superior dependerá de los patrones únicos de expresión de ligandos coestimuladores y coinhibidores por el tumor, el nivel o la densidad de expresión de antígeno, la afinidad de scFv por el antígeno tumoral, la distancia del tumor epítipo de la membrana y variaciones en el diseño del constructo (tales como el espaciador y los dominios transmembrana)^{158,203-207}. Estas variables, y no las diferencias cualitativas en la señalización, pueden explicar en última instancia la variabilidad observada en los ensayos preclínicos, que concluyen alternativamente que 4-1BB o CD28 es superior, según el contexto. De hecho, los constructos de 4-1BB y CD28 usados en este informe son suficientemente diferentes en sus dominios transmembrana que las conclusiones que determinan el dominio coestimulador óptimo no deberían extraerse a partir de este estudio.

Ejemplo 9 - Eficacia de las células T-CAR M28z en células con expresiones MSLN variables

Se evaluó mediante FACS la expresión de MSLN en células cancerosas (por ejemplo, células de cáncer de pulmón A549, H1299 y EKVX, células de mesotelioma MSTO y células Hela) y células normales (por ejemplo, células MRC5). Se muestran los resultados en la figura 57. El número de moléculas de MSLN por célula se cuantificó mediante análisis por FACS con perlas Quantibrite. Se muestran los resultados en la figura 58. Tal como se muestra en las figuras 57 y 58, las células A549Mmc y H1299Mmc transducidas con MSLN tenían la mayor expresión de MSLN, seguidas por las células EKVXM y MSTOGM transducidas con MSLN (o “MGM”). A continuación, se realizó el análisis de expresión de ARNm de MSLN en estas células de pulmón y mesotelioma. Se extrajo el ARNm de células tumorales cultivadas y se sintetizó en ADNc. Se realizó un ensayo Taqman para MSLN y se usó microglobulina B2 como control interno. Los resultados se representan en cambio en veces en relación con la expresión de ARNm de MSLN en células MRC-5, tal como se muestra en la figura 59. De manera acorde a los niveles de expresión de MSLN mostrados en las figuras 57 y 58, las células A549Mmc y H1299Mmc transducidas con MSLN tuvieron el mayor nivel de ARNm de MSLN, seguido de células EKVXM y MGM transducidas con MSLN.

La citotoxicidad de las células T transducidas con CAR M28z se determinó mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr convencionales, tal como se describió anteriormente²²⁰. Se incubaron células T transducidas con CAR M28z y células con niveles de expresión de MSLN variables durante 18 horas a diferentes razones E:D. El antígeno PSMA de direccionamiento a P28z se usó como control negativo. Se muestran los resultados en la figura 60. Tal como se muestra en la figura 60, la citotoxicidad de las células T-CAR M28z era dependiente de antígeno MSLN y proporcional al nivel de expresión de MSLN. Por ejemplo, la citotoxicidad de las células T-CAR M28z en las células A549Mmc que tenían el mayor nivel de expresión de MSLN fue la mayor entre todas las células sometidas a prueba. También se observó que la citotoxicidad de las células T-CAR M28z no era exactamente proporcional a la intensidad del antígeno MSLN en la superficie celular ya que la citotoxicidad puede estar influenciada por varios otros factores, por ejemplo, la cantidad de MSLN intracelular, la expresión de ligandos coestimuladores o coinhibidores en la célula cancerosa, el tamaño celular, la duración de la incubación de células cancerosas/células T en cultivo (que influye a su vez en la expresión de ligandos coinhibidores) y la confluencia de las células cancerosas sembradas en placa.

Ejemplo 10 - Capacidad de proliferación de células T-CAR M28z

Se determinó la acumulación de células T-CAR después de la estimulación de antígeno repetida en presencia de IL-2 exógena, así como en ausencia de IL-2. Se estimularon células T-CAR M28z varias veces con diferentes líneas celulares que expresan diferentes niveles de MSLN (MRC5, EKVX, A549G y A549GM) en presencia de IL-2. Se usó una razón 10:1 y se contaron las células T 7 días después de la estimulación. Se muestran los resultados en las figuras 61 y 62. Tal como se muestra en las figuras 61A y 61B, la acumulación de células T-CAR fue proporcional al nivel de MSLN en las células tumorales.

Ejemplo 11 - Eficacia in vivo de las células T-CAR M28z en el modelo de cáncer de pulmón

Para evaluar la eficacia de las células T transducidas con el CAR M28z frente a células de cáncer de pulmón que expresan una baja o alta expresión de antígeno MSLN en un modelo de cáncer de pulmón ortotópico, se les inyectaron a ratones NSG inmunodeficientes por vía intravenosa 1e6 células A549 que expresan la GFP-luciferasa de luciérnaga y una baja o alta expresión de MSLN (A549G o A549GM, respectivamente). Veintidós días después del establecimiento del tumor, se trataron los ratones por vía intravenosa con una única dosis de 5e4 o 5e5 células T-CAR M28z (figura 63A). Se monitorizó la eficacia antitumoral mediante la evaluación en serie de la carga tumoral mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) tumoral (figura 63B) y análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (figura 63C). Las células T-CAR M28z fueron eficaces contra las células cancerosas con alta expresión de MSLN (A549GM) en ambas dosis. Las células T M28z fueron eficaces para retardar la progresión de la carga tumoral y prolongar la supervivencia frente a células A549G que expresan bajo nivel de MSLN sólo a una dosis mayor de las dos dosis sometidas a prueba. Ambas dosis usadas son dosis mucho menores en comparación

con los experimentos convencionales de células T-CAR publicados. Como conclusión, las células T M28z fueron eficaces para controlar la carga tumoral en ratones con células con baja expresión de MSLN (A549G) y erradicar tumores en ratones con células con alta expresión de antígeno (A549GM).

A ratones NSG inmunodeficientes se les inyectaron por vía intravenosa 1e6 células A549E o A549 M (baja y alta expresión de MSLN, respectivamente, sin GFP-luciferasa) para establecer cáncer de pulmón (figura 64A). Veintidós días después del establecimiento del tumor, se trataron los ratones por vía intravenosa con una única dosis de 2e6 células T-CAR M28z cotransducidas con luciferasa de luciérnaga mejorada (Effluc) para monitorizar la acumulación de células T *in vivo*. Se realizó BLI de células T los días 1, 3, 5, 7 y 12 después de la inyección de células T (figura 64A). Tal como se muestra en las figuras 64B-64D, las células T-CAR se acumularon rápidamente en ratones con alta expresión de MSLN (A549M), alcanzaron su pico el día 5 (momento en el que está eliminándose el tumor) y luego mostraron una disminución de la acumulación. La acumulación de células T-CAR progresó relativamente a un ritmo bajo en ratones con tumores con baja expresión de MSLN (A549E), alcanzó su pico el día 7. Por tanto, la acumulación de células T-CAR M28z dependía del nivel de expresión de antígeno en tumores de cáncer de pulmón.

Bibliografía

1. Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nature reviews. Clinical oncology* 7, 683-692 (2010).
2. Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S. & Ellis, I.O. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* 26, 2568-2581 (2008).
3. Smid, M., et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 68, 3108-3114 (2008).
4. Dent, R., et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13, 4429-4434 (2007).
5. Liedtke, C., et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26, 1275-1281 (2008).
6. Kuo, W.H., et al. Molecular characteristics and metastasis predictor genes of triple-negative breast cancer: a clinical study of triple-negative breast carcinomas. *PLoS One* 7, e45831 (2012).
7. Yau, C., et al. A multigene predictor of metastatic outcome in early stage hormone receptor-negative and triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, R85 (2010).
8. Kim, S.T., et al. Tumor-infiltrating Lymphocytes, Tumor Characteristics, and Recurrence in Patients With Early Breast Cancer. *Am J Clin Oncol* (2012).
9. Li, C.H., et al. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer. *Immunologic research* 51, 71-79 (2011).
10. Brentjens, R.J., et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118, 4817-4828 (2011).
11. Brentjens, R.J., et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine* 5, 177ra138 (2013).
12. Hunder, N.N., et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N.Engl.J.Med.* 358, 2698-2703 (2008).
13. Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A. & Dudley, M.E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat.Rev. Cancer* 8, 299-308 (2008).
14. Dudley, M.E., et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26, 5233-5239 (2008).
15. Brentjens, R.J., et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin.Cancer Res.* 13, 5426-5435 (2007).
16. Gade, T.P., et al. Targeted elimination of prostate cancer by genetically directed human T lymphocytes. *Cancer Res.* 65, 9080-9088 (2005).
17. Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Riviere, I. & Sadelain, M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat.Biotechnol.* 20, 70-75 (2002).
18. Kershaw, M.H., et al. Gene-engineered T cells as a superior adjuvant therapy for metastatic cancer. *J Immunol* 173, 2143-2150 (2004).

19. Sadelain, M., Brentjens, R. & Riviere, I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* (2009).
20. Hollyman, D., et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother* 32, 169-180 (2009).
- 5 21. Sadelain, M., Brentjens, R. & Riviere, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer discovery* 3, 388-398 (2013).
22. Riviere, I., Sadelain, M. & Brentjens, R.J. Novel strategies for cancer therapy: the potential of genetically modified T lymphocytes. *Curr Hematol Rep* 3, 290-297 (2004).
- 10 23. Stephan, M.T., et al. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transco-stimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat.Med.* 13, 1440-1449 (2007).
24. Krause, A., et al. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 619-626 (1998).
25. Gong, M.C., et al. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia*. 1, 123-127 (1999).
- 15 26. Lyddane, C., et al. Cutting Edge: CD28 controls dominant regulatory T cell activity during active immunization. *J.Immunol.* 176, 3306-3310 (2006).
27. Ho, M., et al. Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 11, 3814-3820 (2005).
- 20 28. Hassan, R. & Ho, M. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 44, 46-53 (2008).
29. Zervos, M.D., Bizakis, C. & Pass, H.I. Malignant mesothelioma 2008. *Curr Opin Pulm Med* 14, 303-309 (2008).
30. Palumbo, C., Bei, R., Procopio, A. & Modesti, A. Molecular targets and targeted therapies for malignant mesothelioma. *Current medicinal chemistry* 15, 855-867 (2008).
- 25 31. Roe, O.D., et al. Mesothelin-related predictive and prognostic factors in malignant mesothelioma: a nested case-control study. *Lung Cancer* 61, 235-243 (2008).
32. Pass, H.I., et al. Soluble mesothelin-related peptide level elevation in mesothelioma serum and pleural effusions. *Ann Thorac Surg* 85, 265-272; discussion 272 (2008).
- 30 33. Rodriguez Portal, J.A., et al. Serum Levels of Soluble Mesothelin-Related Peptides in Malignant and Nonmalignant Asbestos-Related Pleural Disease: Relation with Past Asbestos Exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2009).
34. Bharadwaj, U., Li, M., Chen, C. & Yao, Q. Mesothelin-induced pancreatic cancer cell proliferation involves alteration of cyclin E via activation of signal transducer and activator of transcription protein 3. *Mol Cancer Res* 6, 1755-1765 (2008).
- 35 35. Uehara, N., Matsuoka, Y. & Tsubura, A. Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 6, 186-193 (2008).
36. Kaneko, O., et al. A Binding Domain on Mesothelin for CA125/MUC16. *J Biol Chem* 284, 3739-3749 (2009).
37. Servais, E.L., et al. Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients. *Clin Cancer Res* (2012);18:2478-2489.
- 40 38. Wang, Y., Wang, L., Li, D., Wang, H.B. & Chen, Q.F. Mesothelin promotes invasion and metastasis in breast cancer cells. *J Int Med Res* 40, 2109-2116 (2012).
39. Wang, L., et al. Clinicopathological significance of mesothelin expression in invasive breast cancer. *J Int Med Res* 40, 909-916 (2012).
- 45 40. Wu, J.M., et al. Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res* 14, 1938-1946 (2008).
41. Robinson, B.W., et al. Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma. *Lung Cancer* 49 Suppl 1, S109-S111 (2005).

42. Tajima, K., et al. ERC/mesothelin as a marker for chemotherapeutic response in patients with mesothelioma. *Anticancer Res* 28, 3933-3936 (2008).
43. Park, E.K., et al. Soluble mesothelin-related protein in an asbestos-exposed population: the dust diseases board cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 832-837 (2008).
- 5 44. Segawa, T., et al. MESOMARK kit detects C-ERC/mesothelin, but not SMRP with C-terminus. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 915-918 (2008).
45. Amati, M., et al. Profiling tumor-associated markers for early detection of malignant mesothelioma: an epidemiologic study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 163-170 (2008).
- 10 46. van den Heuvel, M.M., Korse, C.M., Bonfrer, J.M. & Baas, P. Noninvasive diagnosis of pleural malignancies: the role of tumour markers. *Lung Cancer* 59, 350-354 (2008).
47. Rizk, N.P., et al. Tissue and Serum Mesothelin Are Potential Markers of Neoplastic Progression in Barrett's Associated Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21, 482-486 (2012).
48. Bera, T.K. & Pastan, I. Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction. *Mol Cell Biol* 20, 2902-2906 (2000).
- 15 49. Kelly, R.J., Sharon, E., Pastan, I. & Hassan, R. Mesothelin-targeted agents in clinical trials and in preclinical development. *Mol Cancer Ther* 11, 517-525 (2012).
50. Hassan, R., et al. Phase I study of SS1P, a recombinant anti-mesothelin immunotoxin given as a bolus I.V. infusion to patients with mesothelin-expressing mesothelioma, ovarian, and pancreatic cancers. *Clin Cancer Res* 13, 5144-5149 (2007).
- 20 51. Thomas, A.M., et al. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J.Exp.Med.* 200, 297-306 (2004).
52. Yokokawa, J., et al. Identification of novel human CTL epitopes and their agonist epitopes of mesothelin. *Clin Cancer Res* 11, 6342-6351 (2005).
- 25 53. Feng, Y., et al. A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* (2009);8:1113-1118.
54. Lanitis, E., et al. Redirected antitumor activity of primary human lymphocytes transduced with a fully human anti-mesothelin chimeric receptor. *Mol Ther* 20, 633-643 (2012).
- 30 55. Moon, E.K., et al. Expression of a functional CCR2 receptor enhances tumor localization and tumor eradication by retargeted human T cells expressing a mesothelin-specific chimeric antibody receptor. *Clin Cancer Res* 17, 4719-4730 (2011).
56. Zhao, Y., et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res* 70, 9053-9061 (2010).
57. Riese, M.J., et al. Enhanced effector responses in activated CD8+ T cells deficient in diacylglycerol kinases. *Cancer Res* 73, 3566-3577 (2013).
- 35 58. Tchou, J., et al. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133, 799-804 (2012).
59. Boggio, K., et al. Ability of systemic interleukin-12 to hamper progressive stages of mammary carcinogenesis in HER2/neu transgenic mice. *Cancer Res* 60, 359-364 (2000).
- 40 60. Czerniecki, B.J., et al. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res* 67, 1842-1852 (2007).
61. Nanni, P., et al. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 194, 1195-1205 (2001).
62. Del Vecchio, M., et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 13, 4677-4685 (2007).
- 45 63. Wesa, A., Kalinski, P., Kirkwood, J.M., Tatsumi, T. & Storkus, W.J. Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient TH1-type antimeelanoma CD4+ T cell responses in vitro. *J Immunother* 30, 75-82 (2007).
64. Curtsinger, J.M., Lins, D.C. & Mescher, M.F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T

cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197, 1141-1151 (2003).

65. Chmielewski, M., Kopecky, C., Hombach, A.A. & Abken, H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* 71, 5697-5706 (2011).

5 66. Voest, E.E., et al. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 87, 581-586 (1995).

67. Lenzi, R., et al. Phase I study of intraperitoneal recombinant human interleukin 12 in patients with Mullerian carcinoma, gastrointestinal primary malignancies, and mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* 8, 3686-3695 (2002).

68. Lenzi, R., et al. Phase II study of intraperitoneal recombinant interleukin-12 (rhIL-12) in patients with peritoneal carcinomatosis (residual disease < 1 cm) associated with ovarian cancer or primary peritoneal carcinoma. *J. Transl.Med.* 5, 66 (2007).

69. Mahvi, D.M., et al. Intratumoral injection of IL-12 plasmid DNA results of a phase I/IB clinical trial. *Cancer Gene Ther.* 14, 717-723 (2007).

70. Kang, W.K., et al. Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum.Gene Ther.* 12, 671-684 (2001).

15 71. Brunda, M.J., et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 178, 1223-1230 (1993).

72. Gyorffy, S., Palmer, K., Podor, T.J., Hitt, M. & Gauldie, J. Combined treatment of a murine breast cancer model with type 5 adenovirus vectors expressing murine angiostatin and IL-12: a role for combined anti-angiogenesis and immunotherapy. *J Immunol* 166, 6212-6217 (2001).

20 73. Bramson, J.L., et al. Direct intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-12 induces regression and long-lasting immunity that is associated with highly localized expression of interleukin-12. *Hum Gene Ther* 7, 1995-2002 (1996).

74. Sabel, M.S., Su, G., Griffith, K.A. & Chang, A.E. Intratumoral delivery of encapsulated IL-12, IL-18 and TNF-alpha in a model of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 122, 325-336 (2010).

25 75. Eliopoulos, N., Francois, M., Boivin, M.N., Martineau, D. & Galipeau, J. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res* 68, 4810-4818 (2008).

76. Bekaii-Saab, T.S., et al. A phase I trial of paclitaxel and trastuzumab in combination with interleukin-12 in patients with HER2/neu-expressing malignancies. *Molecular cancer therapeutics* 8, 2983-2991 (2009).

30 77. Dong, H., et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8, 793-800 (2002).

78. Spranger, S., et al. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Science translational medicine* 5, 200ra116 (2013).

79. Brown, J.A., et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *Journal of immunology* 170, 1257-1266 (2003).

35 80. Ghebeh, H., et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* 8, 190-198 (2006).

81. Ghebeh, H., et al. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC cancer* 8, 57 (2008).

40 82. Crane, C.A., et al. PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene* 28, 306-312 (2009).

83. Ge, Y., Xi, H., Ju, S. & Zhang, X. Blockade of PD-1/PD-L1 immune checkpoint during DC vaccination induces potent protective immunity against breast cancer in hu-SCID mice. *Cancer letters* 336, 253-259 (2013).

84. Topalian, S.L., et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine* 366, 2443-2454 (2012).

45 85. Servais, E.L., et al. An in vivo platform for tumor biomarker assessment. *PLoS One* 6, e26722 (2011).

86. Servais, E.L., Colovos, C., Kachala, S.S. & Adusumilli, P.S. Pre-clinical mouse models of primary and metastatic pleural cancers of the lung and breast and the use of bioluminescent imaging to monitor pleural tumor burden. *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna Chapter 14, Unit 14 21* (2011).

87. Adusumilli, P.S., et al. Real-time diagnostic imaging of tumors and metastases by use of a replication-competent herpes vector to facilitate minimally invasive oncological surgery. *FASEB J.* 20, 726-728 (2006).
88. Adusumilli, P.S., et al. Virally-directed fluorescent imaging (VFI) can facilitate endoscopic staging. *Surg.Endosc.* 20, 628-635 (2006).
- 5 89. Eisenberg, D.P., et al. Real-time intraoperative detection of breast cancer axillary lymph node metastases using a green fluorescent protein-expressing herpes virus. *Ann.Surg.* 243, 824-830 (2006).
90. Eisenberg, D.P., et al. Real-time intraoperative detection of breast cancer axillary lymph node metastases using a green fluorescent protein-expressing herpes virus. *Ann Surg* 243, 824-830; discussion 830-822 (2006).
- 10 91. Servais, E.L., et al. Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients. *Clin Cancer Res* 18, 2478-2489 (2012).
92. Adusumilli, P.S., et al. Intraoperative localization of lymph node metastases with a replication-competent herpes simplex virus. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 132, 1179-1188 (2006).
93. Adusumilli, P.S., et al. Imaging and therapy of malignant pleural mesothelioma using replication-competent herpes simplex viruses. *J.Gene Med.* 8, 603-615 (2006).
- 15 94. Di Stasi, A., et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 365, 1673-1683 (2011).
95. Davila, M.L., Kloss, C.C., Gunset, G. & Sadelain, M. CD19 CAR-targeted T cells induce long-term remission and B Cell Aplasia in an immunocompetent mouse model of B cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 8, e61338 (2013).
- 20 96. Wolchok, J.D., et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369, 122-133 (2013).
97. Hamid, O., et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369, 134-144 (2013).
98. Latouche, J.B. & Sadelain, M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat.Biotechnol.* 18, 405-409 (2000).
- 25 99. Papanicolaou, G.A., et al. Rapid expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells expressing a single HLA allele. *Blood* 102, 2498-2505 (2003).
100. Pegram, H.J., et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* (2012).
- 30 101. Pegram, H.J., et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 119, 4133-4141 (2012).
102. Lee, J.C., et al. In vivo inhibition of human CD19-targeted effector T cells by natural T regulatory cells in a xenotransplant murine model of B cell malignancy. *Cancer Res* 71, 2871-2881 (2011).
103. Santos, E.B., et al. Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase. *Nat Med* 15, 338-344 (2009).
- 35 104. Ponomarev, V., et al. Imaging TCR-dependent NFAT-mediated T-cell activation with positron emission tomography in vivo. *Neoplasia* 3, 480-488 (2001).
105. Song, X., Davidian, M. & Tsiatis, A.A. A semiparametric likelihood approach to joint modeling of longitudinal and time-to-event data. *Biometrics* 58, 742-753 (2002).
- 40 106. Pogoda, K., Niwinska, A., Murawska, M. & Pienkowski, T. Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. *Med Oncol* 30, 388 (2013).
107. Baselga, J., et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 31, 2586-2592 (2013).
- 45 108. Antony VB, Loddenkemper R, Astoul P, Boutin C, Goldstraw P, Hott J, Rodriguez Panadero F, Sahn SA. Management of malignant pleural effusions. *Eur Respir J.* 2001;18:402-419.
109. Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet.* 2005;366:397-408.
110. Anraku M, Cunningham KS, Yun Z, Tsao MS, Zhang L, Keshavjee S, Johnston MR, de PM. Impact of tumor-

- infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;135:823-829.
111. Yamada N, Oizumi S, Kikuchi E, Shinagawa N, Konishi-Sakakibara J, Ishimine A, Aoe K, Gemba K, Kishimoto T, Torigoe T, Nishimura M. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:1543-1549.
112. Suzuki K, Kadota K, Sima CS, Sadelain M, Rusch VW, Travis WD, Adusumilli PS. Chronic inflammation in tumor stroma is an independent predictor of prolonged survival in epithelioid malignant pleural mesothelioma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1721-1728.
113. Bograd AJ, Suzuki K, Vertes E, Colovos C, Morales EA, Sadelain M, Adusumilli PS. Immune responses and immunotherapeutic interventions in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1509-1527.
114. Adusumilli PS. Translational immunotherapeutics: Chemoimmunotherapy for malignant pleural mesothelioma. *Cancer.* 2014
115. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, Kassim SH, Rose JJ, Telford WG, Hakim FT, Halverson DC, Fowler DH, Hardy NM, Mato AR, Hickstein DD, Gea-Banacloche JC, Pavletic SZ, Sportes C, Maric I, Feldman SA, Hansen BG, Wilder JS, Blacklock-Schuber B, Jena B, Bishop MR, Gress RE, Rosenberg SA. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2013;122:4129-4139.
116. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368:1509-1518.
117. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, Chung SS, Stefanski J, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Qu J, Wasielewska T, He Q, Fink M, Shinglot H, Youssif M, Satter M, Wang Y, Hosey J, Quintanilla H, Halton E, Bernal Y, Bouhassira DC, Arcila ME, Gonen M, Roboz GJ, Maslak P, Douer D, Frattini MG, Giralt S, Sadelain M, Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine.* 2014;6:224ra225.
118. Jensen MC, Riddell SR. Design and implementation of adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells. *Immunol Rev.* 2014;257:127-144.
119. Kachala SS, Bograd AJ, Villena-Vargas J, Suzuki K, Servais EL, Kadota K, Chou J, Sima CS, Vertes E, Rusch VW, Travis WD, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin overexpression is a marker of tumor aggressiveness and is associated with reduced recurrence-free and overall survival in early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20:1020-1028.
120. Villena-Vargas J, Adusumilli PS. Mesothelin-targeted immunotherapies for malignant pleural mesothelioma. *Annals of cardiothoracic surgery.* 2012; 1:466-471.
121. Pastan I, Hassan R. Discovery of Mesothelin and Exploiting It as a Target for Immunotherapy. *Cancer Res.* 2014
122. Hassan R, Miller AC, Sharon E, Thomas A, Reynolds JC, Ling A, Kreitman RJ, Miettinen MM, Steinberg SM, Fowler DH, Pastan I. Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression. *Science translational medicine.* 2013;5:208ra147.
123. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhal M, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Haines KM, Heitjan DF, Albelda SM, Carroll RG, Riley JL, Pastan I, June CH. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:3360-3365.
124. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401:708-712.
125. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, de Ru AH, Neijssen J, Griekspoor A, Mesman E, Verreck FA, Spits H, Schlom J, van Veelen P, Neeffes JJ. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med.* 2006;203:1259-1271.
126. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol.* 2009;10:718-726.
127. Zamarin D, Holmgaard RB, Subudhi SK, Park JS, Mansour M, Palese P, Merghoub T, Wolchok JD, Allison JP. Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade

immunotherapy. *Science translational medicine*. 2014;6:226ra232.

128. Kitahara T, Watanabe O, Yamaura A, Makino H, Watanabe T, Suzuki G, Okumura K. Establishment of interleukin 2 dependent cytotoxic T lymphocyte cell line specific for autologous brain tumor and its intracranial administration for therapy of the tumor. *Journal of neuro-oncology*. 1987;4:329-336.
- 5 129. Sigurdson ER, Ridge JA, Kemeny N, Daly JM. Tumor and liver drug uptake following hepatic artery and portal vein infusion. *J Clin Oncol*. 1987;5:1836-1840.
130. Thom AK, Alexander HR, Andrich MP, Barker WC, Rosenberg SA, Fraker DL. Cytokine levels and systemic toxicity in patients undergoing isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor, interferon gamma, and melphalan. *J Clin Oncol*. 1995;13:264-273.
- 10 131. Kawamata F, Kamachi H, Einama T, Homma S, Tahara M, Miyazaki M, Tanaka S, Kamiyama T, Nishihara H, Taketomi A, Todo S. Intracellular localization of mesothelin predicts patient prognosis of extrahepatic bile duct cancer. *Int J Oncol*. 2012;41:2109-2118.
132. Einama T, Homma S, Kamachi H, Kawamata F, Takahashi K, Takahashi N, Taniguchi M, Kamiyama T, Furukawa H, Matsuno Y, Tanaka S, Nishihara H, Taketomi A, Todo S. Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:137-142.
- 15 133. Hassan R, Laszik ZG, Lerner M, Raffeld M, Postier R, Brackett D. Mesothelin is overexpressed in pancreaticobiliary adenocarcinomas but not in normal pancreas and chronic pancreatitis. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:838-845.
134. Frierson HF, Jr, Moskaluk CA, Powell SM, Zhang H, Cerilli LA, Stoler MH, Cathro H, Hampton GM. Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas. *Hum Pathol*. 2003;34:605-609.
- 20 135. Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Ryu B, Rosty C, Goggins M, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Jaffee E, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE) *Clin Cancer Res*. 2001;7:3862-3868.
- 25 136. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, Liu H, Wu MF, Gee AP, Mei Z, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. 2011;118:6050-6056.
137. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, Chew A, Zhao Y, Levine BL, Albelda SM, Kalos M, June CH. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res*. 2014;2:112-120.
- 30 138. Engels B, Chervin AS, Sant AJ, Kranz DM, Schreiber H. Long-term persistence of CD4(+) but rapid disappearance of CD8(+) T cells expressing an MHC class I-restricted TCR of nanomolar affinity. *Mol Ther*. 2012;20:652-660.
139. Zhao Y, Bennett AD, Zheng Z, Wang QJ, Robbins PF, Yu LY, Li Y, Molloy PE, Dunn SM, Jakobsen BK, Rosenberg SA, Morgan RA. High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4+ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines. *J Immunol*. 2007;179:5845-5854.
- 35 140. Stone JD, Aggen DH, Schietinger A, Schreiber H, Kranz DM. A sensitivity scale for targeting T cells with chimeric antigen receptors (CARs) and bispecific T-cell Engagers (BiTEs) *Oncoimmunology*. 2012;1:863-873.
- 40 141. Hassan R, Cohen SJ, Phillips M, Pastan I, Sharon E, Kelly RJ, Schweizer C, Weil S, Laheru D. Phase I clinical trial of the chimeric anti-mesothelin monoclonal antibody MORAb-009 in patients with mesothelin-expressing cancers. *Clin Cancer Res*. 2010;16:6132-6138.
142. Hassan R, Kindler HL, Jahan T, Bazhenova L, Reck M, Thomas A, Pastan I, Parno J, O'Shannessy DJ, Fatato P, Maltzman JD, Wallin BA. Phase II clinical trial of amatuximab, a chimeric anti-mesothelin antibody with pemetrexed and cisplatin in advanced unresectable pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2014
- 45 143. Maus MV, Haas AR, Beatty GL, Albelda SM, Levine BL, Liu X, Zhao Y, Kalos M, June CH. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*. 2013;1:26-31.
144. Wang X, Chang WC, Wong CW, Colcher D, Sherman M, Ostberg JR, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*. 2011;118:1255-1263.
- 50 145. Cooper LJ, Ausubel L, Gutierrez M, Stephan S, Shakeley R, Olivares S, Serrano LM, Burton L, Jensen MC,

- Forman SJ, DiGiusto DL. Manufacturing of gene-modified cytotoxic T lymphocytes for autologous cellular therapy for lymphoma. *Cytotherapy*. 2006;8:105-117.
146. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol*. 2013;31:71-75.
- 5 147. Fedorov VD, Sadelain M, Kloss CC. Novel approaches to enhance the specificity and safety of engineered T cells. *Cancer J*. 2014;20:160-165.
148. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Science translational medicine*. 2013;5:215ra172.
- 10 149. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, Chew A, Zhao Y, Levine BL, Albelda SM, Kalos M, June CHH. Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T Cells Induce Antitumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunol Res*. 2014
150. Suzuki K, Servais EL, Rizk NP, Solomon SB, Sima CS, Park BJ, Kachala SS, Zlobinsky M, Rusch VW, Adusumilli PS. Palliation and pleurodesis in malignant pleural effusion: the role for tunneled pleural catheters. *J Thorac Oncol*. 2011;6:762-767.
- 15 151. van Herpen CM, van der Laak JA, de Vries IJ, van Krieken JH, de Wilde PC, Balvers MG, Adema GJ, De Mulder PH. Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1899-1909.
- 20 152. Carpenter SG, Carson J, Fong Y. Regional liver therapy using oncolytic virus to target hepatic colorectal metastases. *Semin Oncol*. 2010;37:160-169.
153. McCoy JL, Herberman RB, Rosenberg EB, Donnelly FC, Levine PH, Alford C. 51 Chromium-release assay for cell-mediated cytotoxicity of human leukemia and lymphoid tissue-culture cells. *National Cancer Institute monograph*. 1973;37:59-67.
- 25 154. Stiles BM, Adusumilli PS, Bhargava A, Stanziale SF, Kim TH, Chan MK, Huq R, Wong R, Rusch VW, Fong Y. Minimally invasive localization of oncolytic herpes simplex viral therapy of metastatic pleural cancer. *Cancer Gene Ther*. 2006;13:53-64.
155. Rabinovich BA, Ye Y, Etto T, Chen JQ, Levitsky HI, Overwijk WW, Cooper LJ, Gelovani J, Hwu P. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:14342-14346.
- 30 156. Na IK, Markley JC, Tsai JJ, Yim NL, Beattie BJ, Klose AD, Holland AM, Ghosh A, Rao UK, Stephan MT, Serganova I, Santos EB, Brentjens RJ, Blasberg RG, Sadelain M, van den Brink MR. Concurrent visualization of trafficking, expansion, and activation of T lymphocytes and T-cell precursors in vivo. *Blood*. 2010;116:e18-25.
157. Sadelain M, Riviere I, and Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):35-45.
- 35 158. Sadelain M, Brentjens R, and Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer discovery*. 2013;3(4):388-98.
159. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, Bartido S, Stefanski J, Taylor C, Olszewska M, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine*. 2013;5(177):177ra38.
- 40 160. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011;118(18):4817-28.
161. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, Chung SS, Stefanski J, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine*. 2014;6(224):224ra25.
- 45 162. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-18.
163. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, and June CH. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine*. 2011;3(95):95ra73.
- 50

164. Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena-Vargas J, Colovos C, Servais E, Plotkin J, Jones DR, and Sadelain M. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Science translational medicine*. 2014;6(261):261ra151.
- 5 165. Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Ryu B, Rosty C, Goggins M, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Jaffee E, Yeo CJ, et al. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):3862-8.
166. Frierson HF, Jr., Moskaluk CA, Powell SM, Zhang H, Cerilli LA, Stoler MH, Cathro H, and Hampton GM. Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas. *Hum Pathol*. 2003;34(6):605-9.
- 10 167. Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, et al. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer*. 2006;5(1):50.
168. Kachala SS, Bograd AJ, Villena-Vargas J, Suzuki K, Servais EL, Kadota K, Chou J, Sima CS, Vertes E, Rusch VW, et al. Mesothelin overexpression is a marker of tumor aggressiveness and is associated with reduced recurrence-free and overall survival in early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(4):1020-8.
- 15 169. Li M, Bharadwaj U, Zhang R, Zhang S, Mu H, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C, and Yao Q. Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(2):286-96.
170. Rizk NP, Servais EL, Tang LH, Sima CS, Gerdes H, Fleisher M, Rusch VW, and Adusumilli PS. Tissue and serum mesothelin are potential markers of neoplastic progression in Barrett's associated esophageal adenocarcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2012;21(3):482-6.
- 20 171. Servais EL, Colovos C, Rodriguez L, Bograd AJ, Nitadori J, Sima C, Rusch VW, Sadelain M, and Adusumilli PS. Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(9):2478-89.
- 25 172. Tozbikian G, Brogi E, Kadota K, Catalano J, Akram M, Patil S, Ho AY, Reis-Filho JS, Weigelt B, Norton L, et al. Mesothelin expression in triple negative breast carcinomas correlates significantly with basal-like phenotype, distant metastases and decreased survival. *PLoS One*. 2014;9(12):e114900.
- 30 173. McGray AJ, Hallett R, Bernard D, Swift SL, Zhu Z, Teoderascu F, Vanseggelen H, Hassell JA, Hurwitz AA, Wan Y, et al. Immunotherapy-induced CD8(+) T Cells Instigate Immune Suppression in the Tumor. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2014;22(1):206-18.
174. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, and Gajewski TF. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Science translational medicine*. 2013;5(200):200ra116.
- 35 175. Moon EK, Wang LC, Dolfi DV, Wilson CB, Ranganathan R, Sun J, Kapoor V, Scholler J, Pure E, Milone MC, et al. Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2014;20(16):4262-73.
176. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(8):711-23.
- 40 177. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013;369(2):122-33.
178. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(26):2443-54.
- 45 179. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, Alaparthi S, Berman D, Jure-Kunkel M, Siemers NO, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(7):1019-31.
- 50 180. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-8.

181. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, Guida M, Hyams DM, Gomez H, Bastholt L, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *Journal of translational medicine*. 2011;9(204).
- 5 182. Nesbeth YC, Martinez DG, Toraya S, Scarlett UK, Cubillos-Ruiz JR, Rutkowski MR, and Conejo-Garcia JR. CD4+ T cells elicit host immune responses to MHC class II-negative ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells. *Journal of immunology*. 2010;184(10):5654-62.
183. Spear P, Barber A, and Sentman CL. Collaboration of chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells and host T cells for optimal elimination of established ovarian tumors. *Oncoimmunology*. 2013;2(4):e23564.
- 10 184. John LB, Devaud C, Duong CP, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, Chow MT, Smyth MJ, Kershaw MH, and Darcy PK. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clin Cancer Res*. 2013;19(20):5636-46.
185. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, Salomao D, Cheville J, Hirano F, Lin W, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2003;63(19):6501-5.
- 15 186. Feng Y, Xiao X, Zhu Z, Streaker E, Ho M, Pastan I, and Dimitrov DS. A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(5):1113-8.
187. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, Yeh R, Matsushita M, La Perle K, Quintas-Cardama A, Larson SM, and Sadelain M. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res*. 2007;13(18 Pt 1):5426-35.
- 20 188. Servais EL, Colovos C, Kachala SS, and Adusumilli PS. Pre-clinical mouse models of primary and metastatic pleural cancers of the lung and breast and the use of bioluminescent imaging to monitor pleural tumor burden. *Current protocols in pharmacology / editorial board, SJ Enna*. 2011;Chapter 14(Unit14 21.
189. Servais EL, Suzuki K, Colovos C, Rodriguez L, Sima C, Fleisher M, Rusch VW, Sadelain M, and Adusumilli PS. An in vivo platform for tumor biomarker assessment. *PLoS One*. 2011;6(10):e26722.
- 25 190. Adusumilli PS, Stiles BM, Chan MK, Mullerad M, Eisenberg DP, Ben-Porat L, Huq R, Rusch VW, and Fong Y. Imaging and therapy of malignant pleural mesothelioma using replication-competent herpes simplex viruses. *The journal of gene medicine*. 2006;8(5):603-15.
191. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, and Carreno BM. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *European journal of immunology*. 2002;32(3):634-43.
- 30 192. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(7):1027-34.
- 35 193. Koehler H, Kofler D, Hombach A, and Abken H. CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack. *Cancer research*. 2007;67(5):2265-73.
194. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhai M, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Haines KM, Heitjan DF, Albelda SM, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(9):3360-5.
- 40 195. Zhao Y, Moon E, Carpenito C, Paulos CM, Liu X, Brennan AL, Chew A, Carroll RG, Scholler J, Levine BL, et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res*. 2010;70(22):9053-61.
196. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. 2011;118(23):6050-6.
- 45 197. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, Chew A, Zhao Y, Levine BL, Albelda SM, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(2):112-20.
- 50 198. Curran MA, Geiger TL, Montalvo W, Kim M, Reiner SL, Al-Shamkhani A, Sun JC, and Allison JP. Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *J Exp Med*. 2013;210(4):743-55.

199. Hirschhorn-Cymerman D, Budhu S, Kitano S, Liu C, Zhao F, Zhong H, Lesokhin AM, Avogadri-Connors F, Yuan J, Li Y, et al. Induction of tumoricidal function in CD4+ T cells is associated with concomitant memory and terminally differentiated phenotype. *J Exp Med*. 2012;209(11):2113-26.
- 5 200. Song C, Sadashivaiah K, Furusawa A, Davila E, Tamada K, and Banerjee A. Eomesodermin is required for antitumor immunity mediated by 4-1BB-agonist immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014;3(1):e27680.
201. Schietinger A, Delrow JJ, Basom RS, Blattman JN, and Greenberg PD. Rescued tolerant CD8 T cells are preprogrammed to reestablish the tolerant state. *Science*. 2012;335(6069):723-7.
- 10 202. Kao C, Oestreich KJ, Paley MA, Crawford A, Angelosanto JM, Ali MA, Intlekofer AM, Boss JM, Reiner SL, Weinmann AS, et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. *Nature immunology*. 2011;12(7):663-71.
203. James SE, Greenberg PD, Jensen MC, Lin Y, Wang J, Till BG, Raubitschek AA, Forman SJ, and Press OW. Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane. *Journal of immunology*. 2008;180(10):7028-38.
- 15 204. James SE, Greenberg PD, Jensen MC, Lin Y, Wang J, Budde LE, Till BG, Raubitschek AA, Forman SJ, and Press OW. Mathematical modeling of chimeric TCR triggering predicts the magnitude of target lysis and its impairment by TCR downmodulation. *Journal of immunology*. 2010;184(8):4284-94.
205. Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, et al. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3 zeta Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8+ T Cells. *Journal of immunology*. 2015;194(3):911-20.
- 20 206. Hombach AA, Schildgen V, Heuser C, Finnern R, Gilham DE, and Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: the position of the binding epitope within the target molecule determines the efficiency of activation of redirected T cells. *Journal of immunology*. 2007;178(7):4650-7.
207. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, and Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *Journal of immunology*. 2004;173(12):7647-53.
- 25 208. Foster AE, Dotti G, Lu A, Khalil M, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM, and Bollard CM. Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor. *Journal of immunotherapy*. 2008;31(5):500-5.
- 30 209. Bollard CM, Rossig C, Calonge MJ, Huls MH, Wagner HJ, Massague J, Brenner MK, Heslop HE, and Rooney CM. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood*. 2002;99(9):3179-87.
- 35 210. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, Smith JP, Walker AJ, Kohler ME, Venkateshwara VR, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*. 2015.
211. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, and Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682-7.
212. Mueller SN, and Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(21):8623-8.
- 40 213. Riese MJ, Wang LC, Moon EK, Joshi RP, Ranganathan A, June CH, Koretzky GA, and Albelda SM. Enhanced effector responses in activated CD8+ T cells deficient in diacylglycerol kinases. *Cancer Res*. 2013;73(12):3566-77.
214. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, King PD, Larson S, Weiss M, Riviere I, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*. 2003;9(3):279-86.
- 45 215. Gade TP, Hassen W, Santos E, Gunset G, Saudemont A, Gong MC, Brentjens R, Zhong XS, Stephan M, Stefanski J, et al. Targeted elimination of prostate cancer by genetically directed human T lymphocytes. *Cancer research*. 2005;65(19):9080-8.
216. Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I, and Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther*. 2010;18(2):413-20.
- 50 217. Markley JC, and Sadelain M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated

rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood*. 2010;115(17):3508-19.

218. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, Tabar V, Mo Q, Studer L, and Sadelain M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(31):12759-64.

219. Hollyman D, Stefanski J, Przybylowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Taylor C, Yeh R, Capacio V, Olszewska M, Hosey J, et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother*. 2009;32(2):169-80.

220. McCoy JL, Herberman RB, Rosenberg EB, Donnelly FC, Levine PH, and Alford C. 51 Chromium-release assay for cell-mediated cytotoxicity of human leukemia and lymphoid tissue-culture cells. *National Cancer Institute monograph*. 1973;37(59-67).

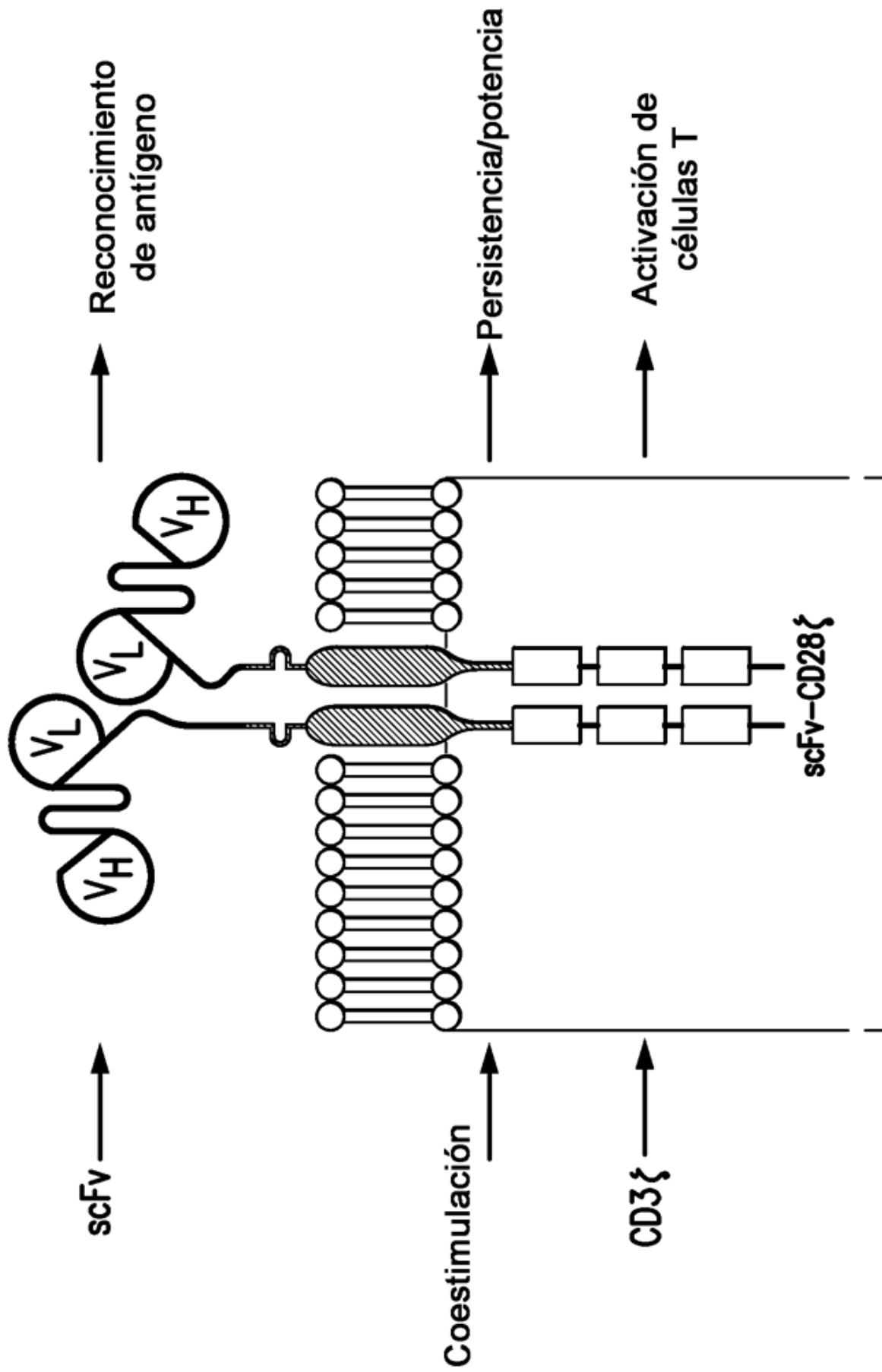
A partir de la descripción anterior, resulta evidente que pueden realizarse variaciones y modificaciones a la invención descrita en el presente documento para adoptarla para diversos usos y condiciones. Tales realizaciones también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), en el que el scFv comprende:
 - 5 una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12, una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:13, una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:14, una región variable de cadena ligera CDR2 que
 - 10 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:16.
2. CAR según la reivindicación 1, en el que el scFv es un scFv humano.
3. CAR según la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR reconoce mesotelina humana con un nivel de expresión de mesotelina de aproximadamente 1.000 o más sitios de
 - 15 unión a mesotelina/célula.
4. CAR según la reivindicación 1, en el que el scFv comprende una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO:1, y/o una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:5 o los aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:3; y opcionalmente en el que el scFv comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende los
 - 20 aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO:1; y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO:5; o (b) una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO:1; y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-107 de SEQ ID NO: 3.
5. CAR según la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular se une específicamente a mesotelina humana con una afinidad de unión (K_d) de desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 25 nM.
6. CAR según la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular comprende un ligador entre una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del dominio de unión a
 - 30 antígeno extracelular, y/o una secuencia líder que se une de manera covalente al extremo 5'-terminal del dominio de unión a antígeno extracelular, y opcionalmente la secuencia líder comprende un polipéptido CD8.
7. CAR según la reivindicación 1, en el que el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8, un polipéptido CD28, un polipéptido CD3 ζ , un polipéptido CD4, un polipéptido 4-1BB, un polipéptido OX40, un polipéptido ICOS, un polipéptido CTLA-4, un polipéptido PD-1, un polipéptido LAG-3, un polipéptido 2B4, un
 - 35 polipéptido BTLA, un péptido sintético (no basado en una proteína asociada con la respuesta inmunitaria), o una combinación de los mismos; y opcionalmente en el que el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8 o un polipéptido CD28.
8. CAR según la reivindicación 1, en el que el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3 ζ , y opcionalmente en el que el dominio intracelular comprende además al menos una región de señalización coestimuladora, y opcionalmente en el que la al menos una región de señalización coestimuladora
 - 40 comprende un polipéptido CD28, un polipéptido 4-1BB, un polipéptido OX40, un polipéptido ICOS, un polipéptido PD-1, un polipéptido CTLA-4, un polipéptido LAG-3, un polipéptido 2B4, un polipéptido BTLA, un péptido sintético (no basado en una proteína asociada con la respuesta inmunitaria), o una combinación de los mismos.
9. CAR según la reivindicación 1, en el que (a) el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8 y el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3 ζ , y opcionalmente el CAR es Mz; (b) el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD28 y el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3 ζ y un dominio de señalización coestimulador que comprende un polipéptido CD28, y opcionalmente el CAR es
 - 45 M28z; o (c) el dominio transmembrana comprende un polipéptido CD8 y el dominio intracelular comprende un polipéptido CD3 ζ y un dominio de señalización coestimulador que comprende un polipéptido 4-1BB, y opcionalmente el CAR es MBBz.
10. CAR según la reivindicación 1, en el que el CAR se expresa de manera recombinante y/o se expresa a partir de un vector, y opcionalmente en el que el vector es un vector $\square$ -retroviral.
11. Célula inmunorreactiva que comprende el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Célula inmunorreactiva según la reivindicación 11, que comprende además al menos un ligando
 - 55

- coestimulador exógeno, y/o al menos una citocina exógena, y opcionalmente en la que el al menos un ligando coestimulador se selecciona del grupo que consiste en 4-1BBL, CD80, CD86, CD70, OX40L, CD48, TNFRSF14, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente en la que el ligando coestimulador es 4-1BBL, y opcionalmente en la que la al menos una citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21, y combinaciones de las mismas, y opcionalmente en la que la al menos una citocina es IL-12.
- 5
13. Célula inmunorreactiva según la reivindicación 11 ó 12, en la que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula T, un linfocito citolítico natural (NK, *natural killer*), un linfocito T citotóxico (CTL), una célula T reguladora, una célula madre embrionaria humana y una célula madre pluripotente a partir de la cual pueden diferenciarse células linfoides; y opcionalmente en la que la célula es una célula T.
- 10
14. Célula inmunorreactiva según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en la que la célula inmunorreactiva expresa desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4 números de copias de vector/célula del CAR.
15. Célula inmunorreactiva según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, que comprende además un receptor de reconocimiento de antígeno que se une a un antígeno diferente de mesotelina humana, y opcionalmente en la que el antígeno es un antígeno tumoral o de patógeno, y opcionalmente en la que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en anhidrasa carbónica IX (CAIX), antígeno carcinoembrionario (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, un antígeno de una célula infectada por citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, un antígeno de superficie celular), glicoproteína 2 epitelial (EGP 2), glicoproteína 40 epitelial (EGP-40), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), proteína tirosina cinasas receptoras erb-B2,3,4, proteína de unión a folato (FBP), receptor de acetilcolina fetal (AChR), receptor a de folato, gangliósido G2 (GD2), gangliósido G3 (GD3), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), subunidad alfa-2 del receptor de interleucina 13 (IL-13R α 2), cadena ligera κ , receptor de dominio de inserto de cinasa (KDR), Lewis A (CA19.9), Lewis Y (LeY), molécula de adhesión celular L1 (L1CAM), familia A de antígeno de melanoma, 1 (MAGE-A1), mucina 16 (Muc-16), mucina 1 (Muc-1), ligandos de NKG2D, antígeno de cáncer de testículo NY-ESO-1, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), factor de crecimiento endotelial vascular R2 (VEGF-R2), proteína tumoral de Wilms (WT-1), receptor transmembrana de proteína tirosina cinasa de tipo 1 (ROR1), y una combinación de los mismos.
- 20
- 25
- 30
16. Célula inmunorreactiva según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en la que la célula inmunorreactiva expresa una o más moléculas de adhesión, y opcionalmente en la que la molécula de adhesión aumenta la avidéz del CAR; y/o en la que la molécula de adhesión se selecciona del grupo que consiste en CD2, VLA-4, y combinaciones de los mismos.
- 35
17. Célula inmunorreactiva según cualquiera de las reivindicaciones 11-16, para su uso en la reducción de la carga tumoral en un sujeto, el aumento o alargamiento de la supervivencia de un sujeto que tiene una neoplasia, el aumento de la producción de citocinas inmunoactivadoras en respuesta a una célula cancerosa o un patógeno en un sujeto, la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, o la prevención del rechazo de injerto en un sujeto que es un receptor de un trasplante de órgano.
- 40
18. Célula inmunorreactiva para su uso según la reivindicación 17, en la que la célula inmunorreactiva reduce el número de células tumorales, reduce el tamaño tumoral y/o erradica el tumor en el sujeto.
19. Célula inmunorreactiva para su uso según la reivindicación 17 ó 18, en la que (a) el tumor es un tumor sólido, y opcionalmente en la que el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, tumor pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos; (b) la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos, y/o (c) la citocina inmunoactivadora se selecciona del grupo que consiste en (GM-CSF), IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, factor 7 regulador de interferón (IRF7), y combinaciones de los mismos, y opcionalmente en la que la citocina inmunoactivadora se selecciona del grupo que consiste en (GM-CSF), IFN- α , TNF- α , y combinaciones de los mismos.
- 45
- 50
- 55
20. Célula inmunorreactiva para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, que comprende además administrar al menos un agente inmunomodulador, y opcionalmente en la que el al menos un agente inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en agentes inmunoestimuladores, agentes de bloqueo inmunitario de punto de control, agentes de radioterapia, agentes de quimioterapia, y

- combinaciones de los mismos, y opcionalmente en la que (a) los agentes inmunoestimuladores se seleccionan del grupo que consiste en IL-12, un anticuerpo monoclonal coestimulador agonista, y combinaciones de los mismos; (b) el anticuerpo monoclonal coestimulador agonista se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-4-1BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-ICOS, y combinaciones de los mismos; y/o (c) los agentes de bloqueo inmunitario de punto de control se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-CTLA-4, anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-B7-H3, anticuerpos anti-TIM3, y combinaciones de los mismos, y opcionalmente en la que el agente inmunoestimulador es IL-12, el anticuerpo monoclonal coestimulador agonista es un anticuerpo anti-4-1BB, y/o el agente de bloqueo inmunitario de punto de control es un anticuerpo anti-PD-L1.
21. Célula inmunorreactiva para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en la que la célula inmunorreactiva se administra por vía pleural al sujeto.
22. Célula inmunorreactiva para su uso según la reivindicación 17, en la que la célula inmunorreactiva es para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto o la prevención del rechazo de injerto en un sujeto que es un receptor de un trasplante de órgano, en la que la célula inmunorreactiva es una célula inmunoinhibidora, y opcionalmente en la que la célula inmunoinhibidora es una célula T reguladora.
23. Célula inmunorreactiva para su uso según la reivindicación 17 ó 22, en la que la enfermedad inflamatoria es pancreatitis.
24. Célula inmunorreactiva para su uso según la reivindicación 17 ó 22, en la que la célula inmunorreactiva es para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto o la prevención del rechazo de injerto en un sujeto que es un receptor de un trasplante de órgano, en la que el sujeto es un receptor de un trasplante de órgano, y opcionalmente en la que el sujeto es un receptor de un trasplante de páncreas.
25. Célula inmunorreactiva para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17-24, en la que el sujeto es un ser humano.
26. Método para producir una célula inmunorreactiva que se une a mesotelina humana, que comprende introducir en la célula inmunorreactiva una secuencia de ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en el que el dominio de unión a antígeno extracelular comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), en el que el scFv comprende:
- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:13, una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:14, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:15, y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:16.
27. Ácido nucleico que codifica para el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
28. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 27, y opcionalmente en el que el vector es un vector $\square$ -retroviral.
29. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la célula inmunorreactiva según una cualquiera de las reivindicaciones 11-16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente que es para tratar una neoplasia, y opcionalmente en la que la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos.
30. Kit para tratar o prevenir una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad inflamatoria, un trasplante alogénico o rechazo de injerto, que comprende la célula inmunorreactiva según una cualquiera de las reivindicaciones 11-16 o el ácido nucleico según la reivindicación 27, y opcionalmente en el que el kit comprende además instrucciones escritas para usar la célula inmunorreactiva para tratar a un sujeto que tiene una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, una enfermedad inflamatoria, un trasplante alogénico o rechazo de injerto; y opcionalmente en el que la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pleural, glioblastoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, sarcoma sinovial, carcinoma tímico, carcinoma de endometrio, cáncer de estómago, colangiocarcinoma, y una combinación de los mismos.



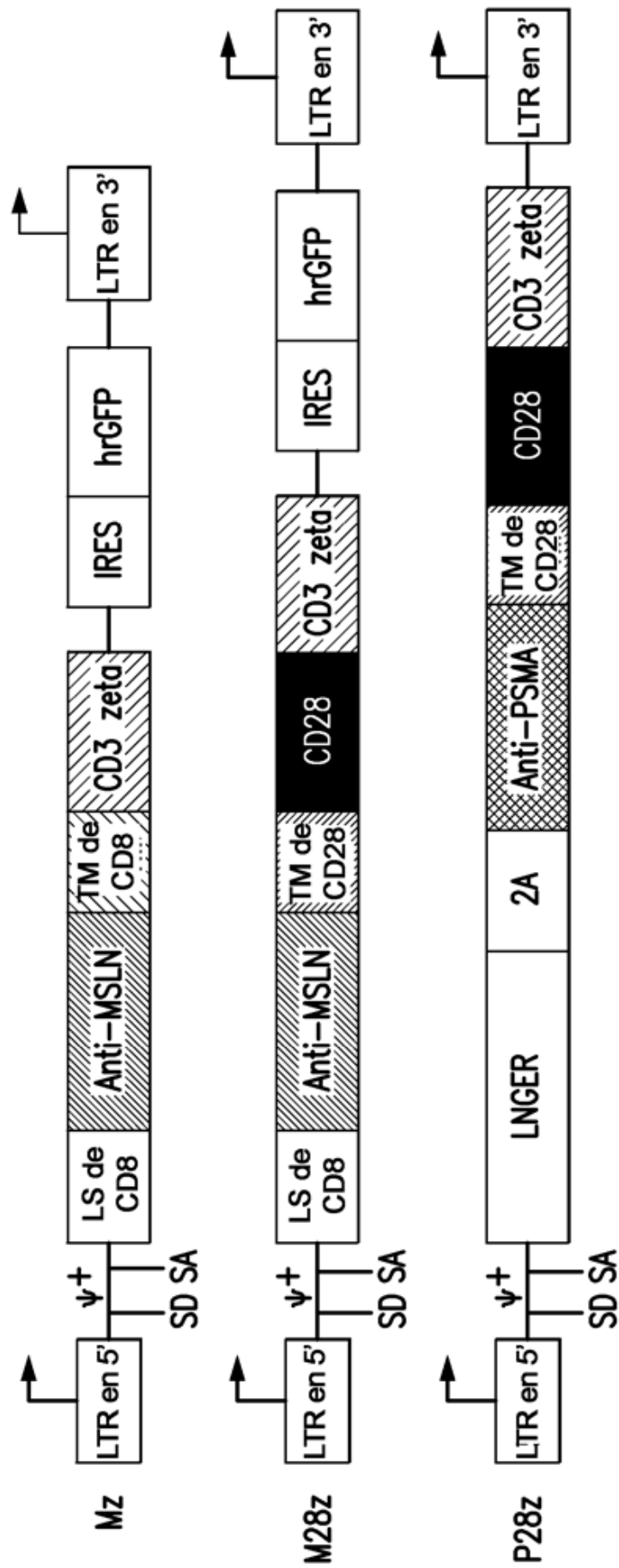


FIG. 2A

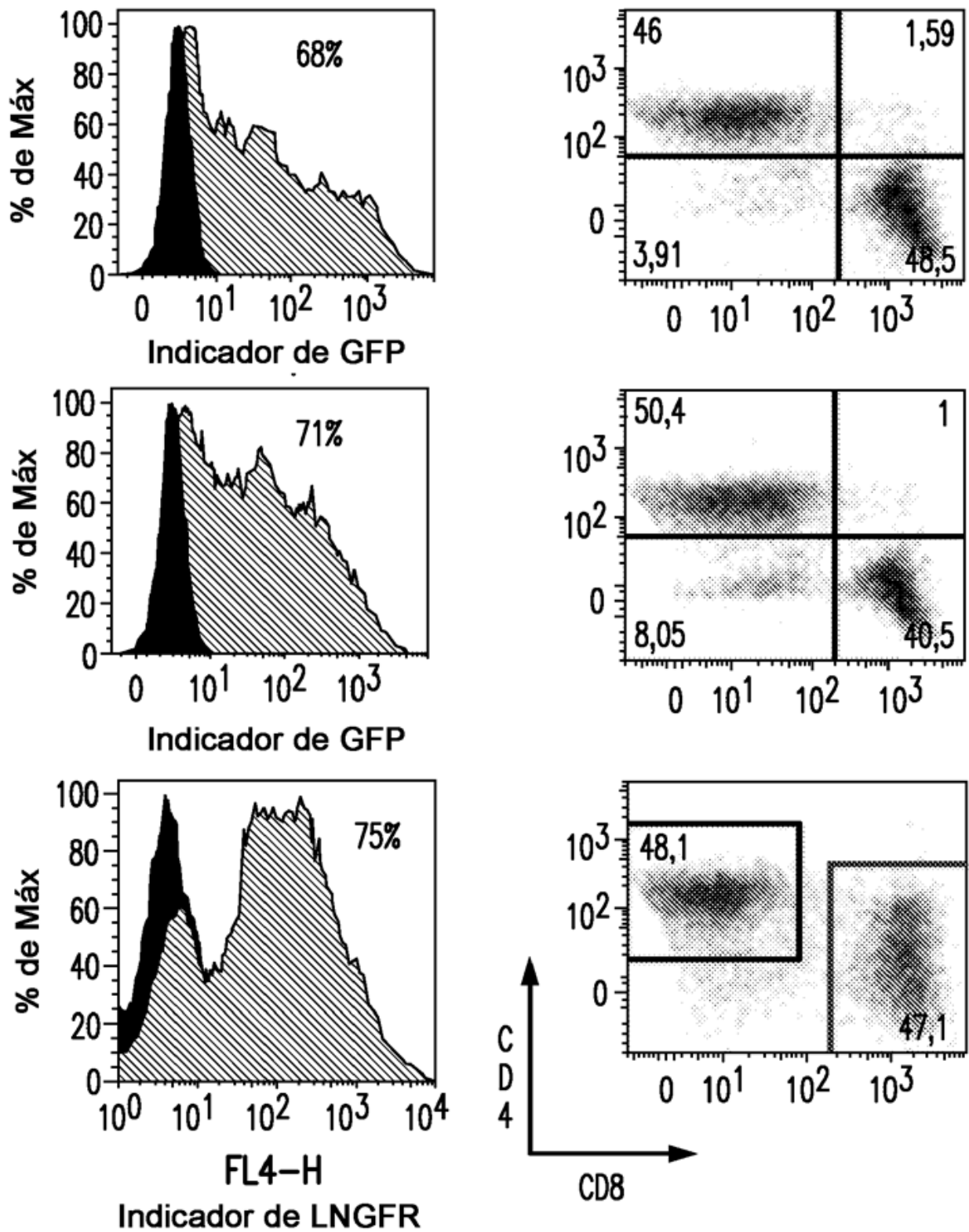


FIG. 2B

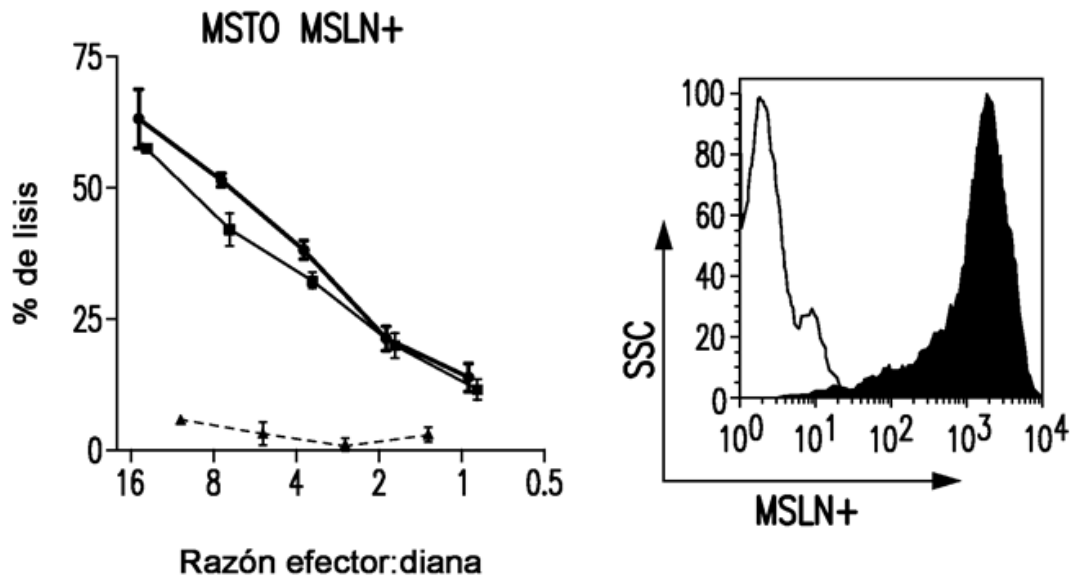


FIG. 2C

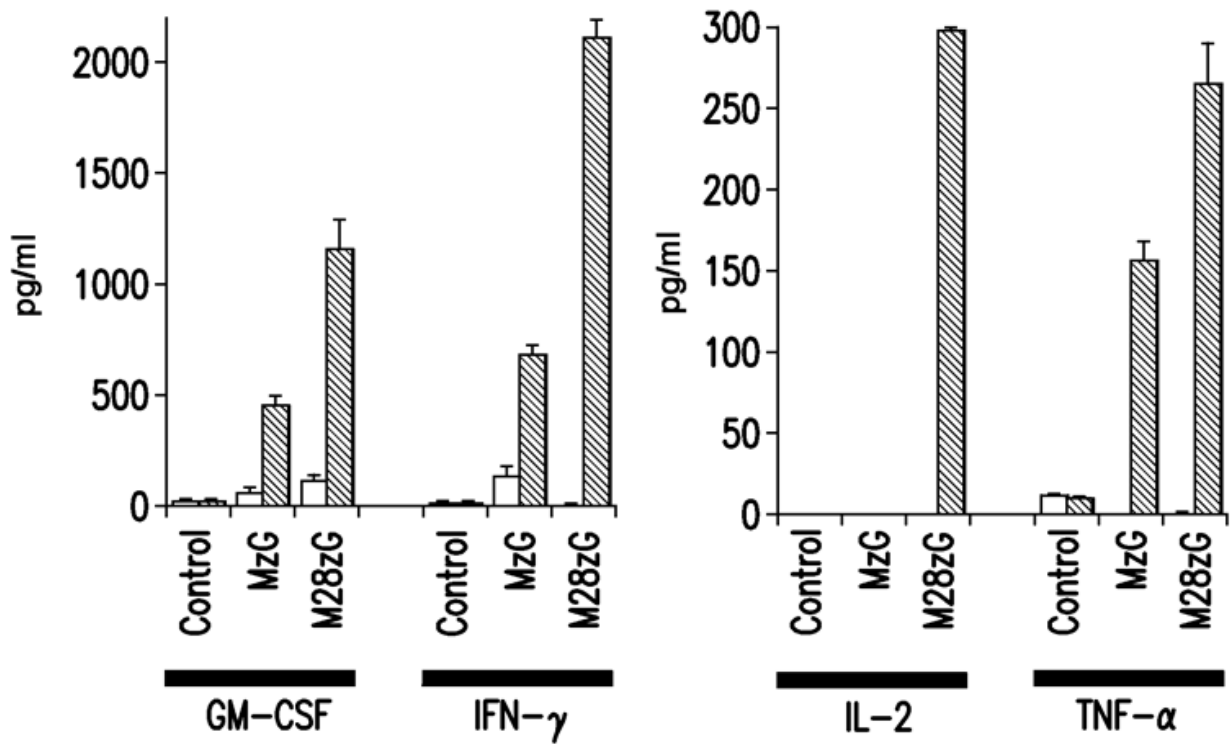


FIG. 2D

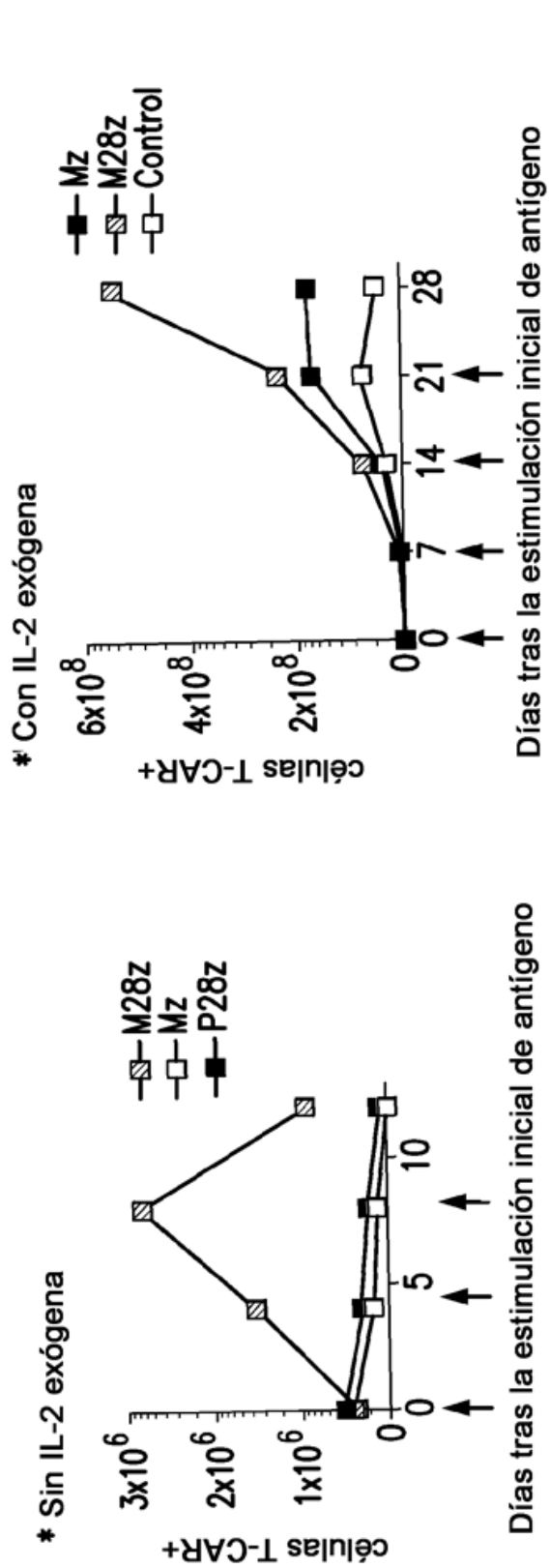


FIG. 2E

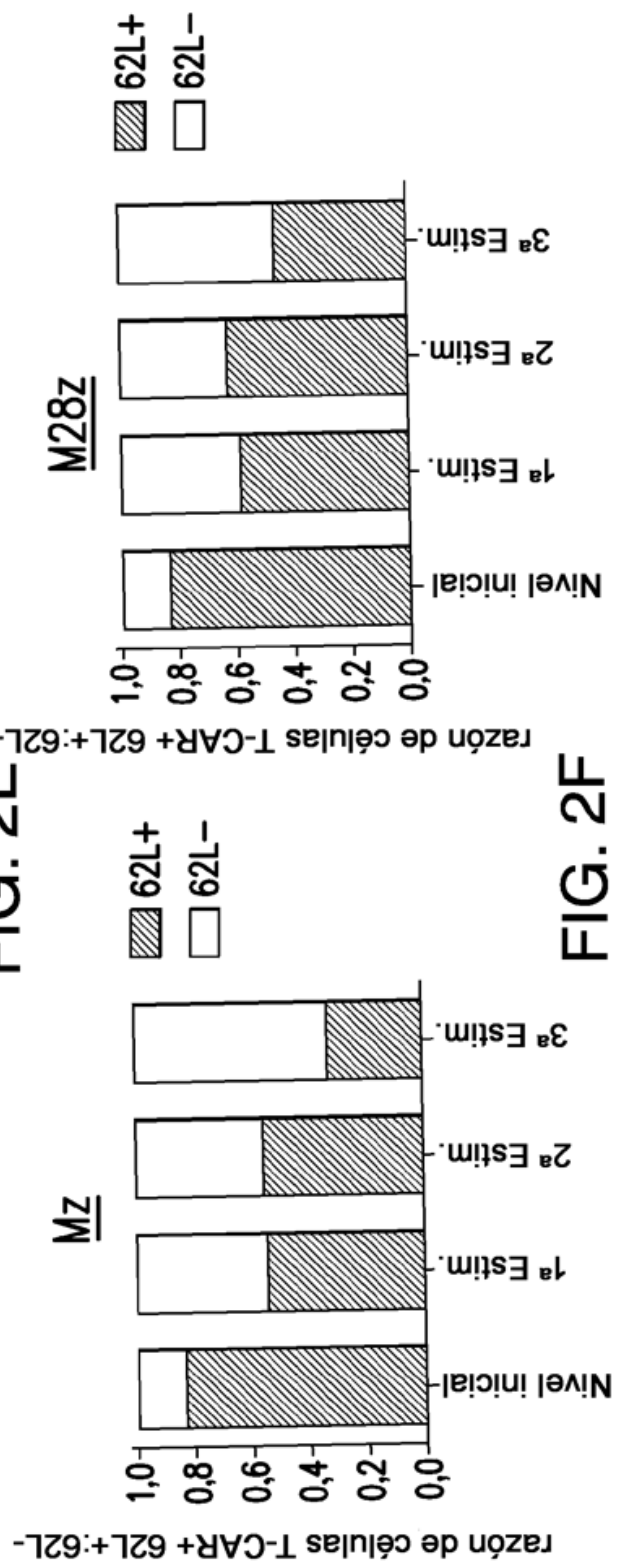


FIG. 2F

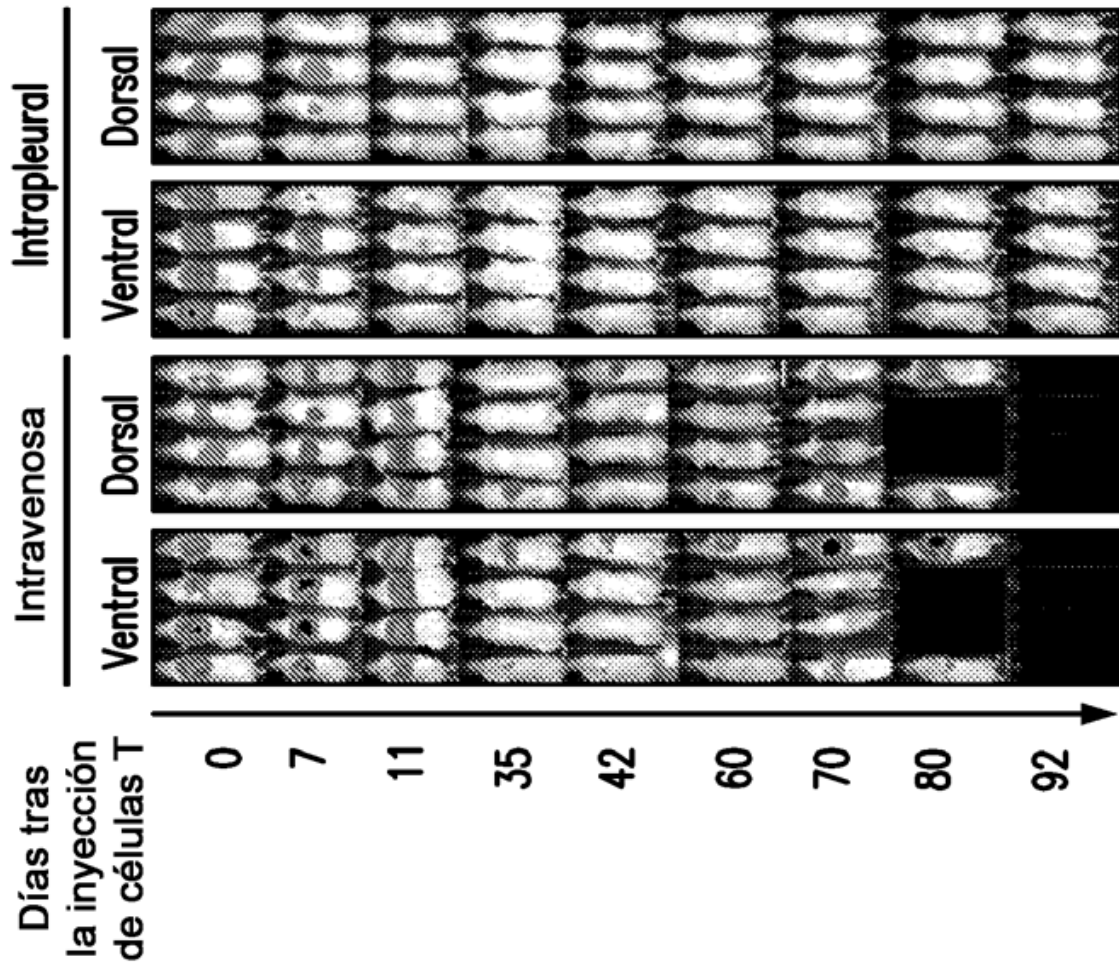


FIG. 3B

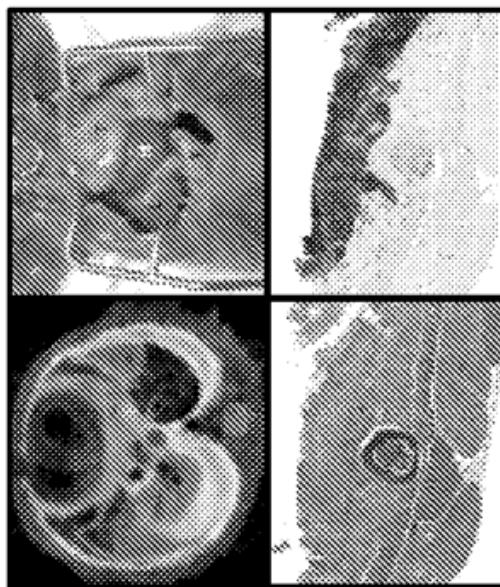


FIG. 3A

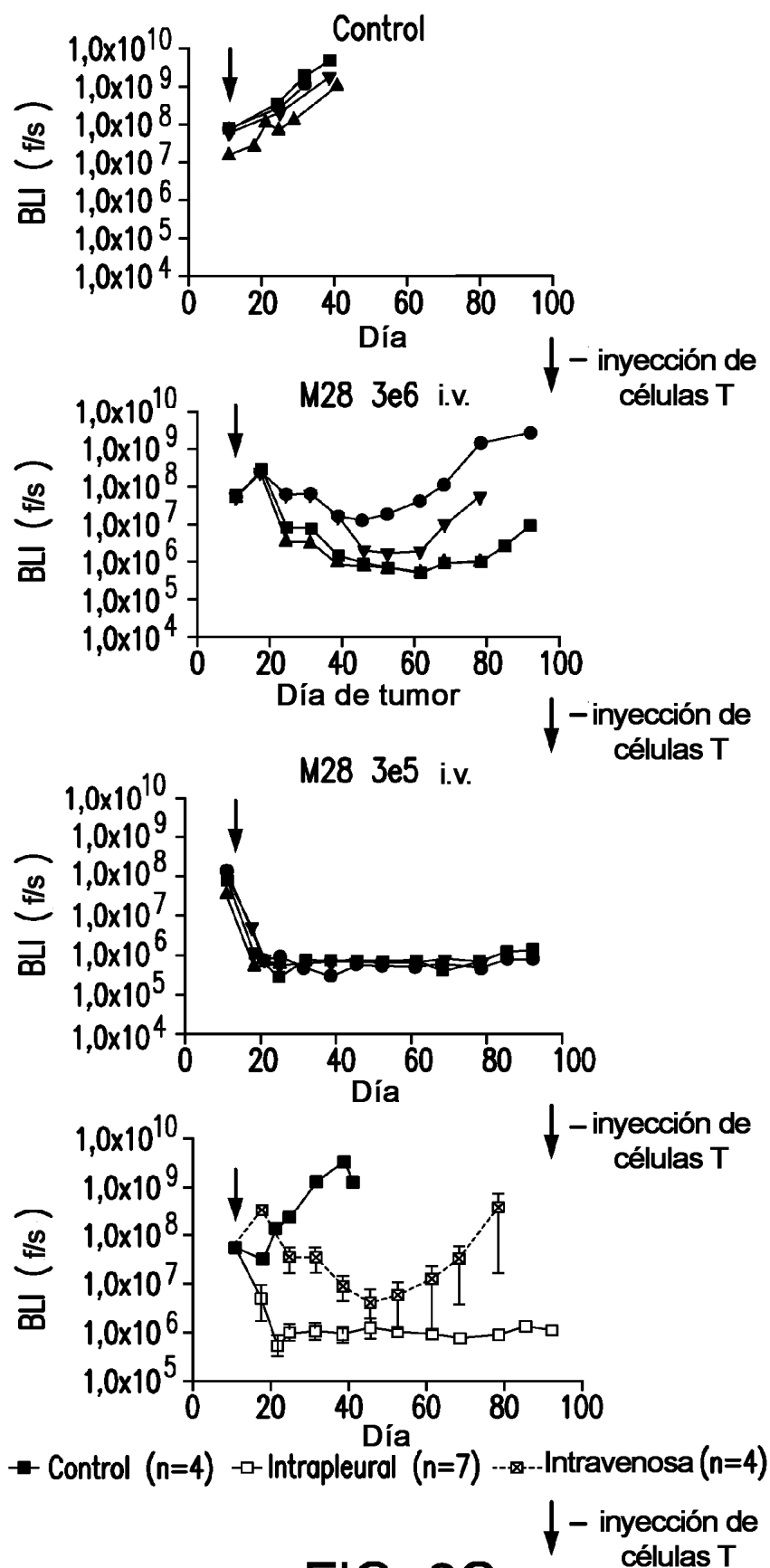
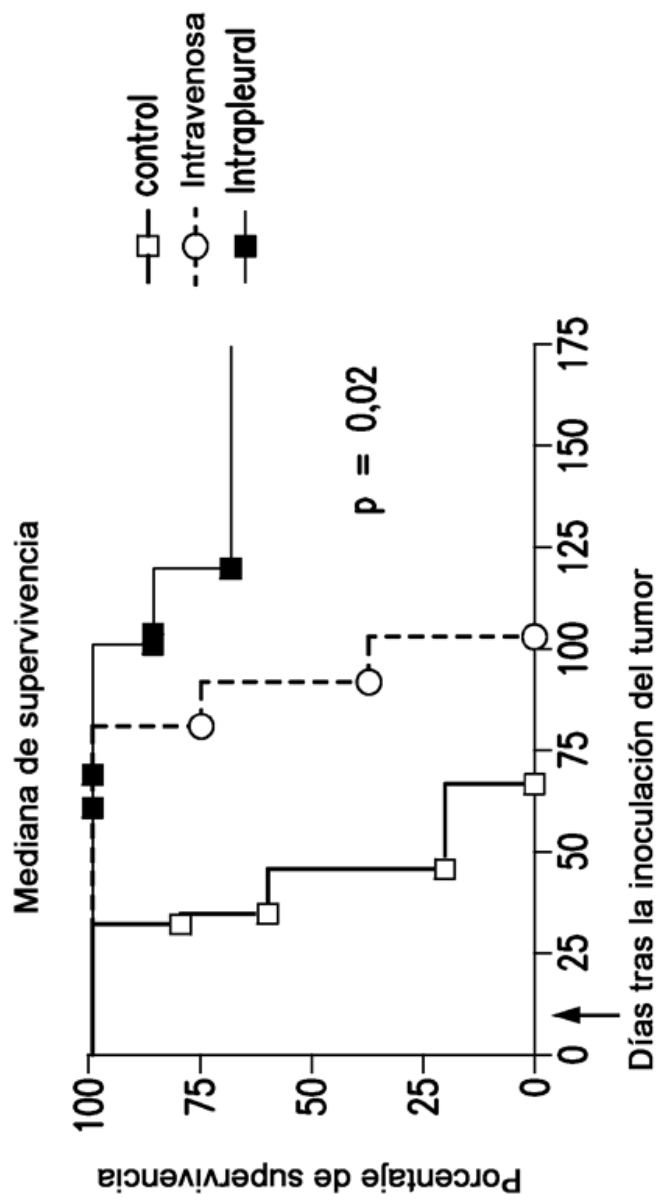


FIG. 3C



↑ inyección de células T

FIG. 3D

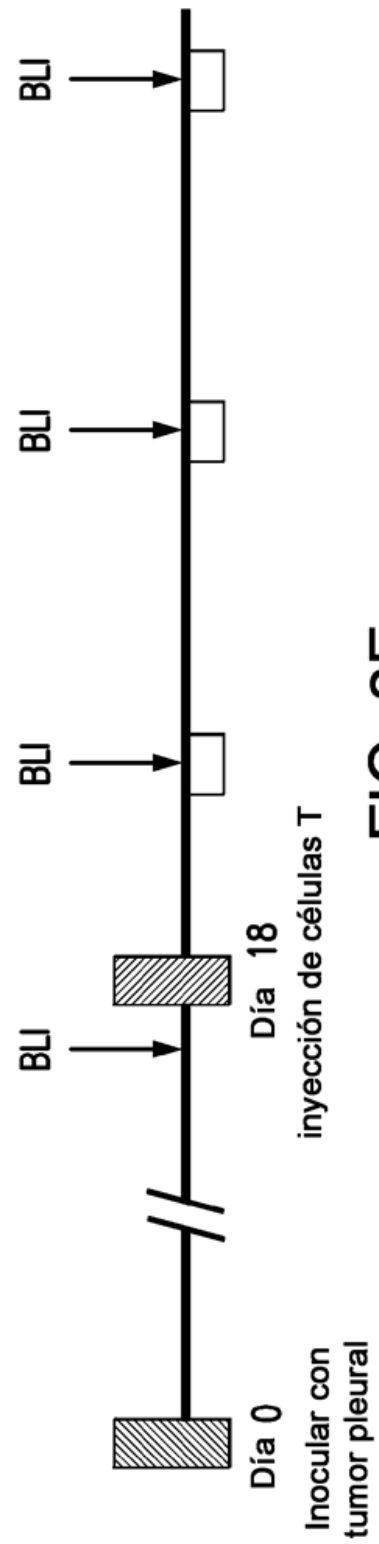


FIG. 3E

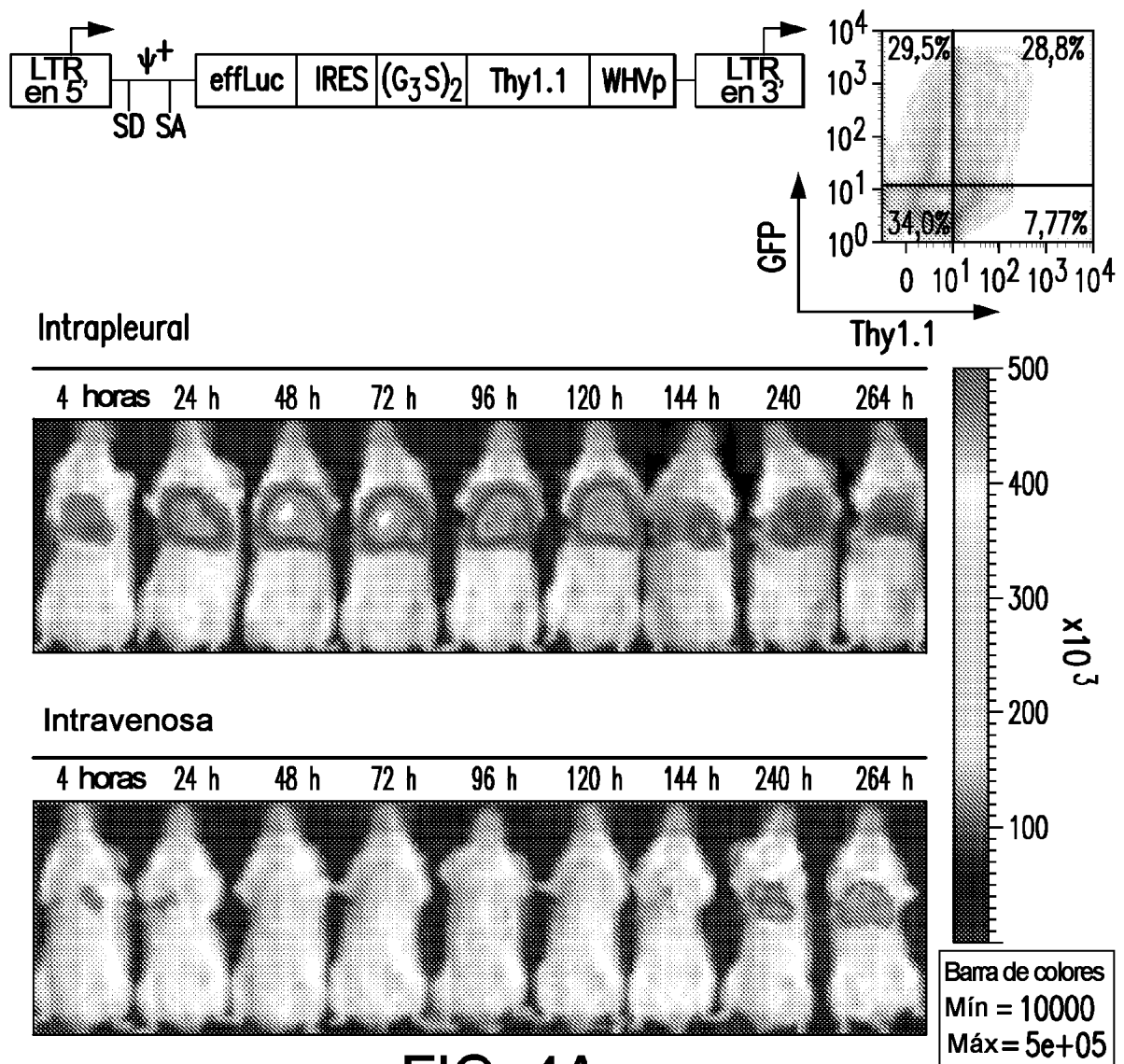


FIG. 4A

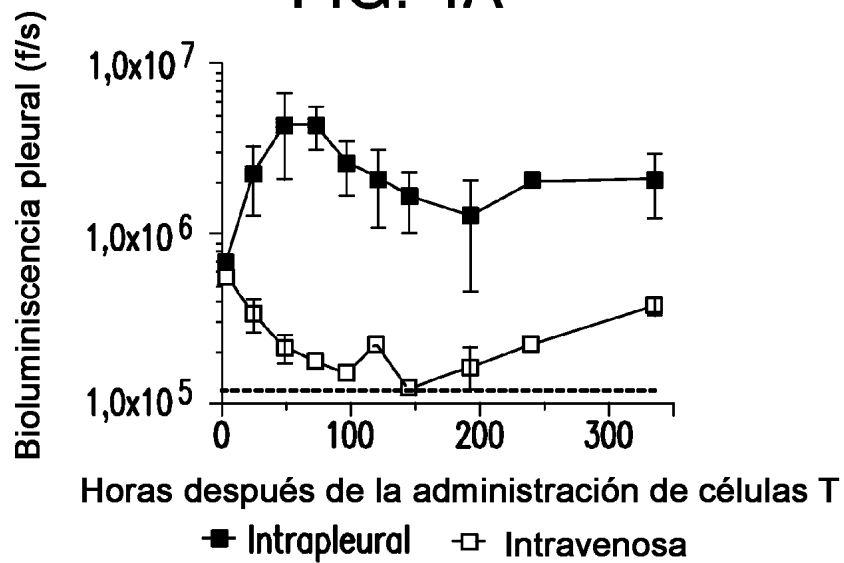


FIG. 4B

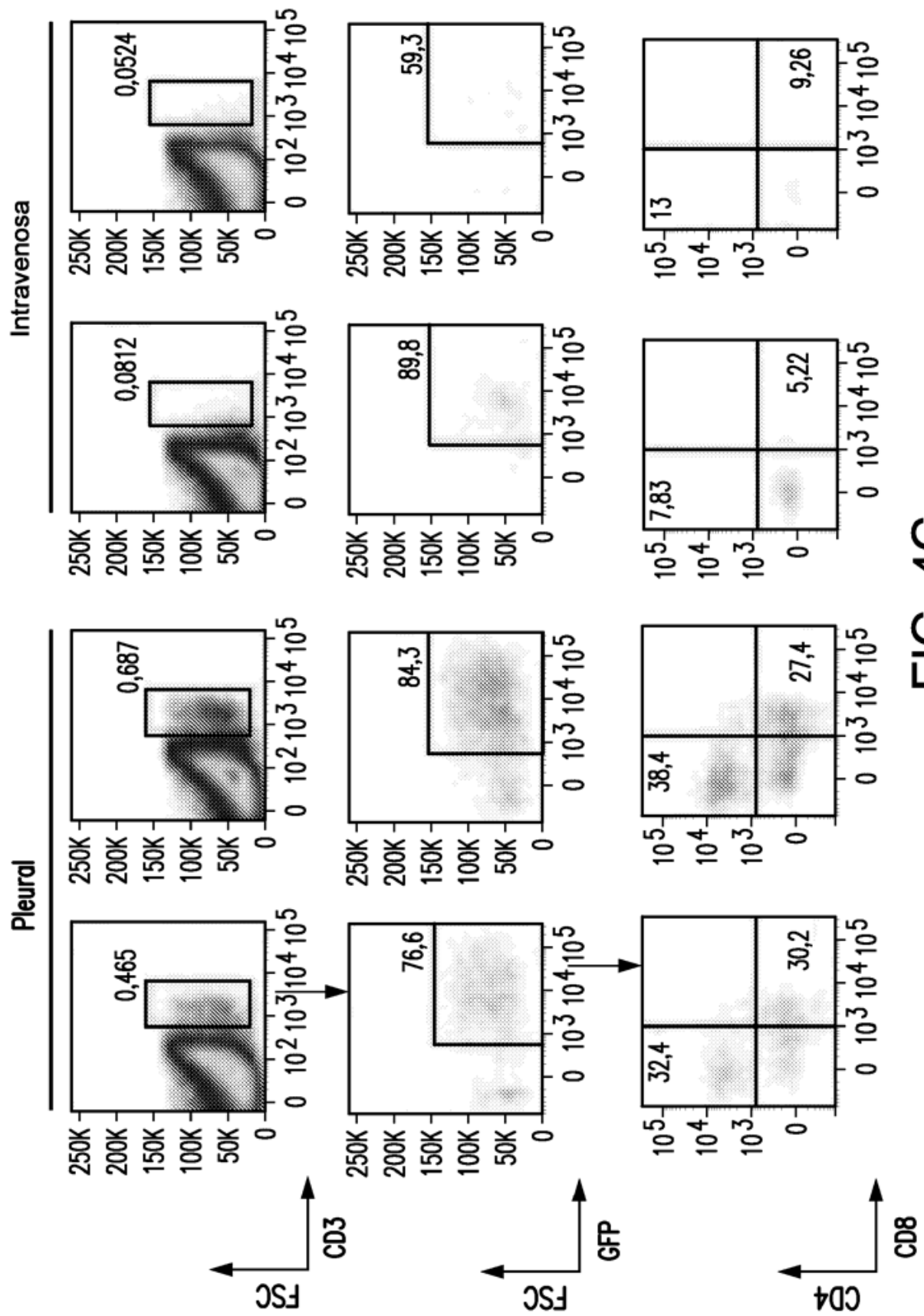


FIG. 4C

Imunohistoquímica de células T (CD3)

6 horas 1 semana

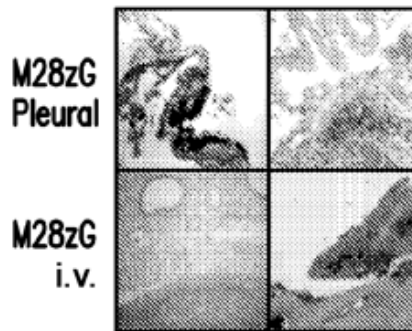


FIG. 4D

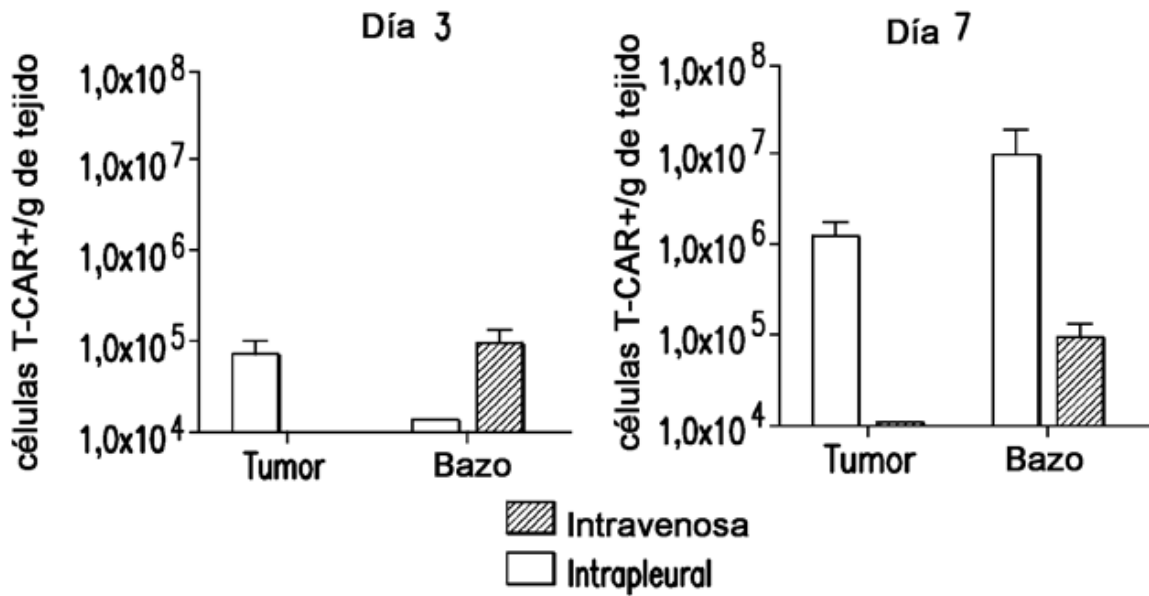


FIG. 4E

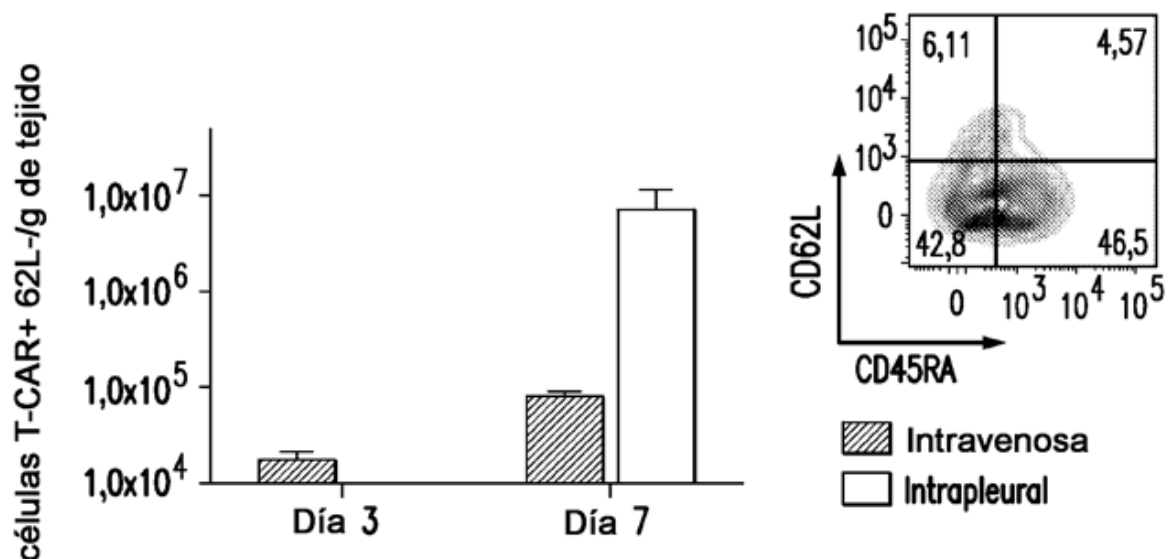


FIG. 4F

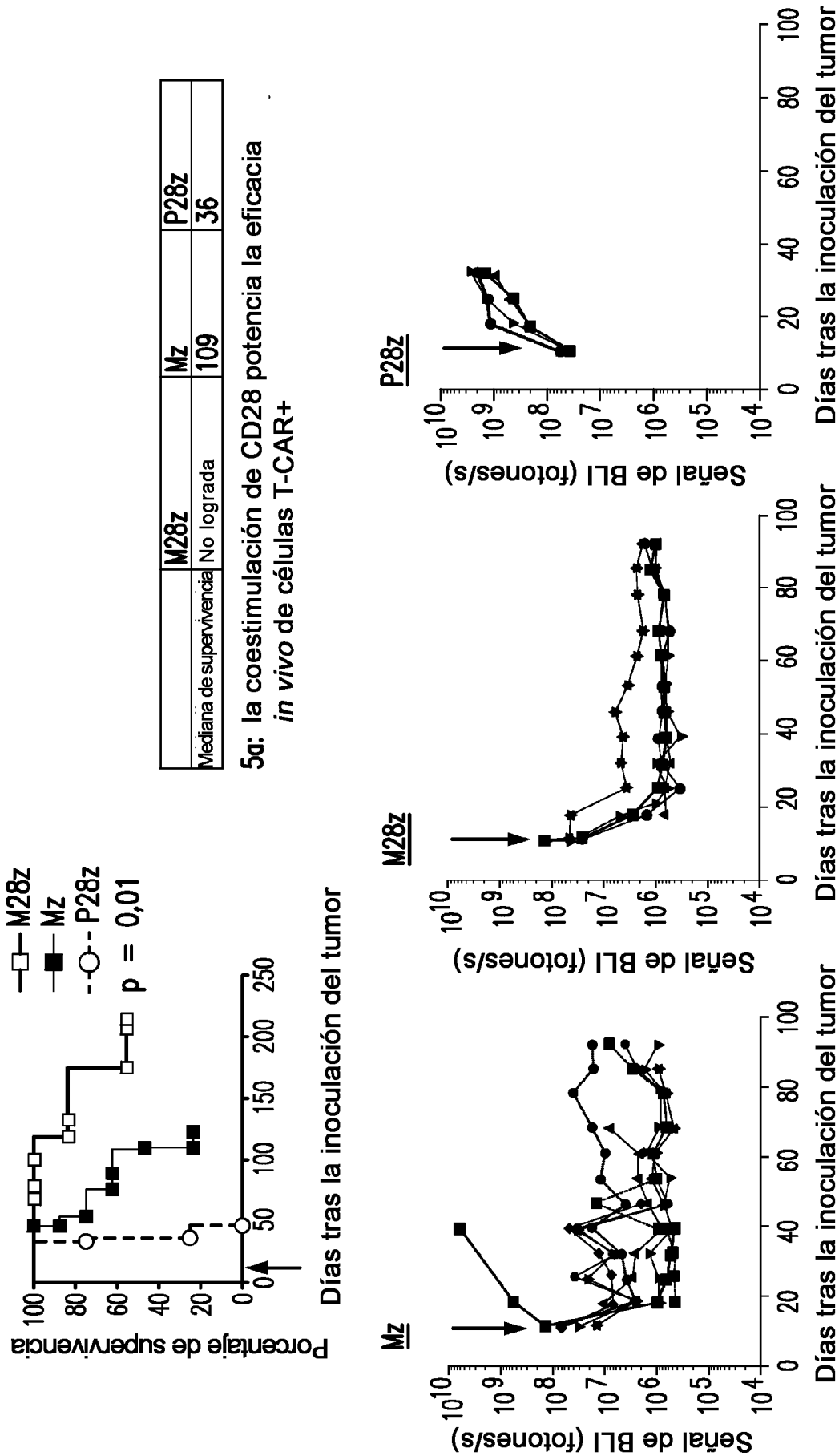
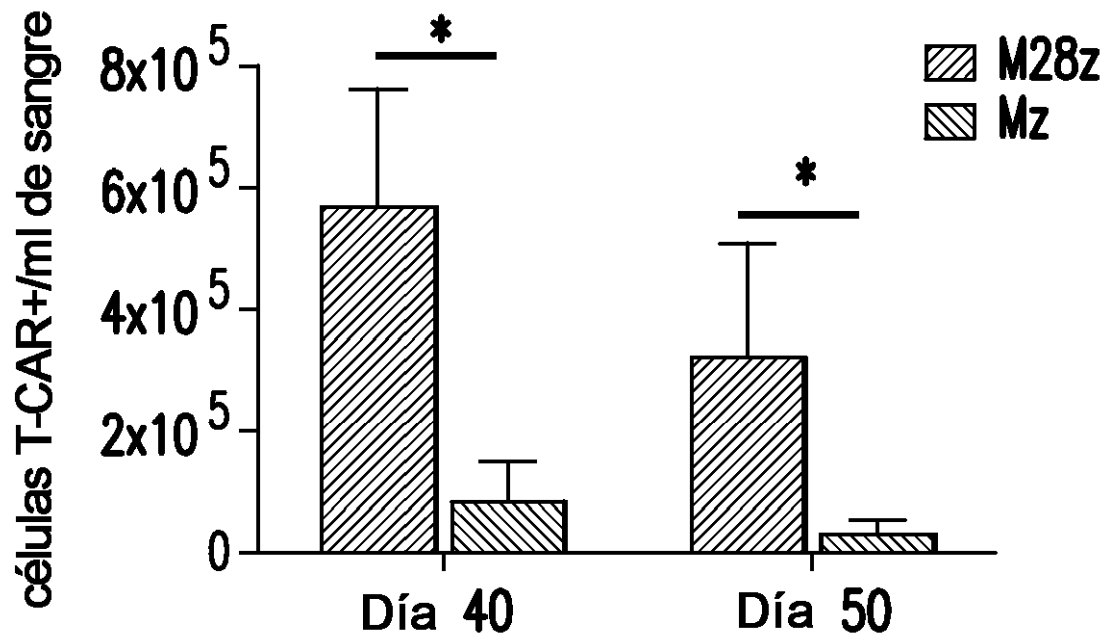
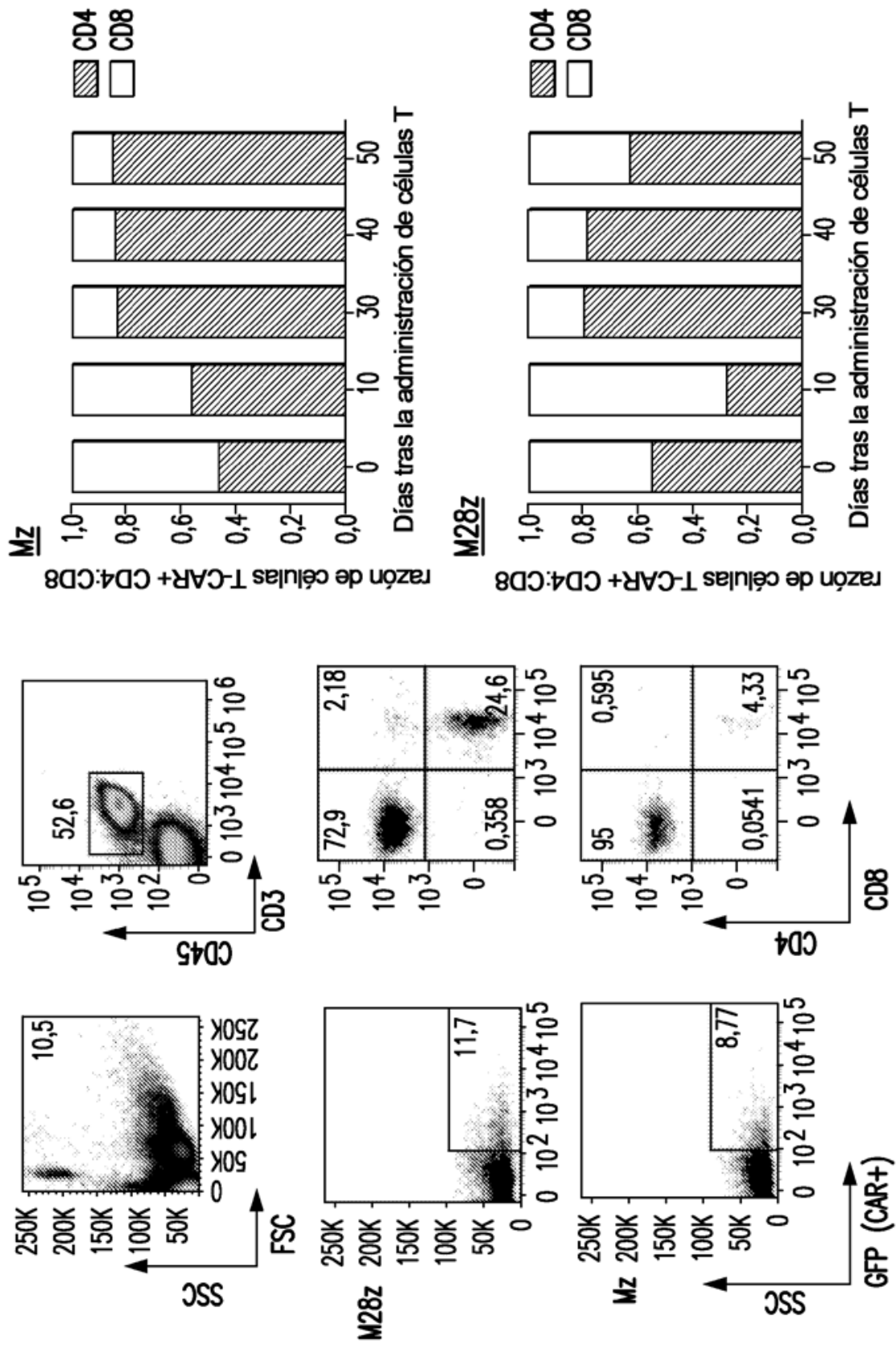


FIG. 5A



5b: la coestimulación de CD28 potencia la persistencia de células T-CAR+

FIG. 5B



5c: las células T-CAR+ persistentes son predominantemente CD4+

FIG. 5C

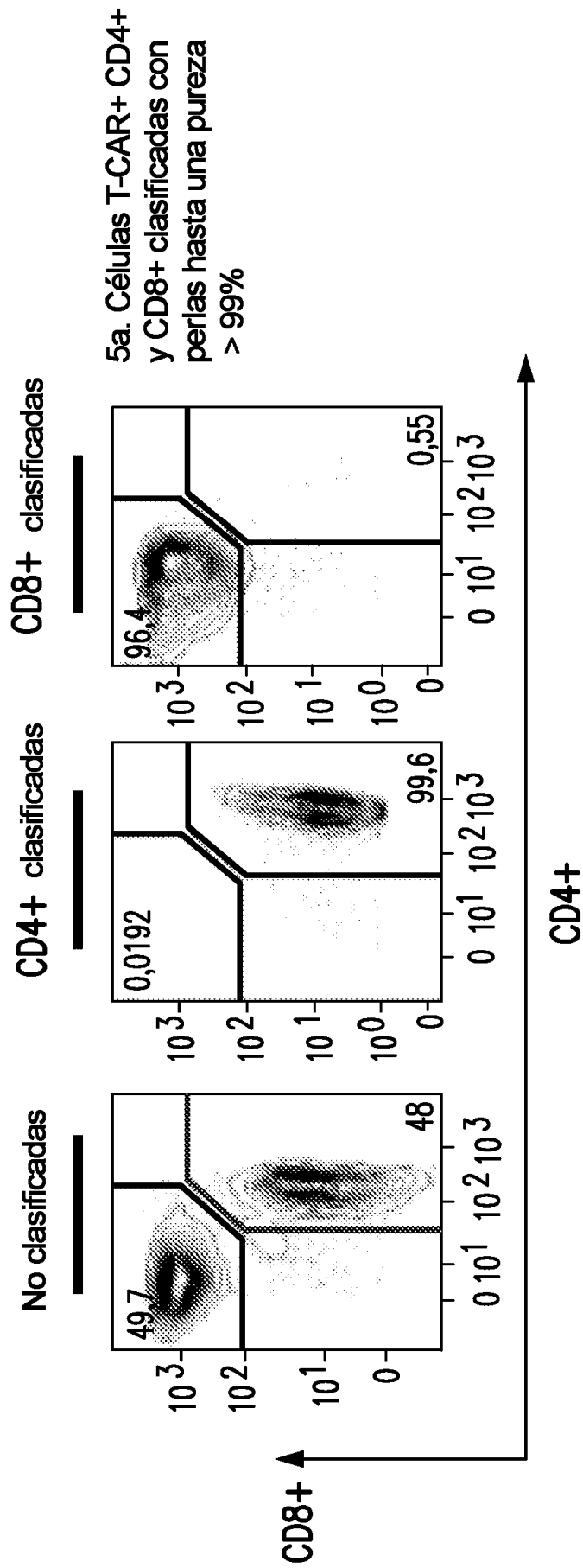


FIG. 6A

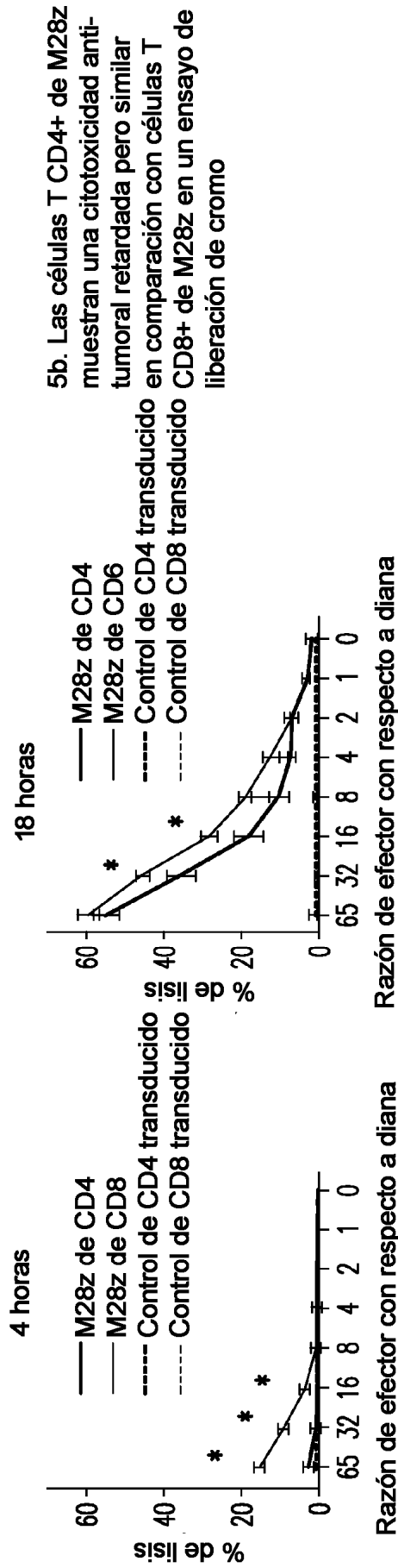


FIG. 6B

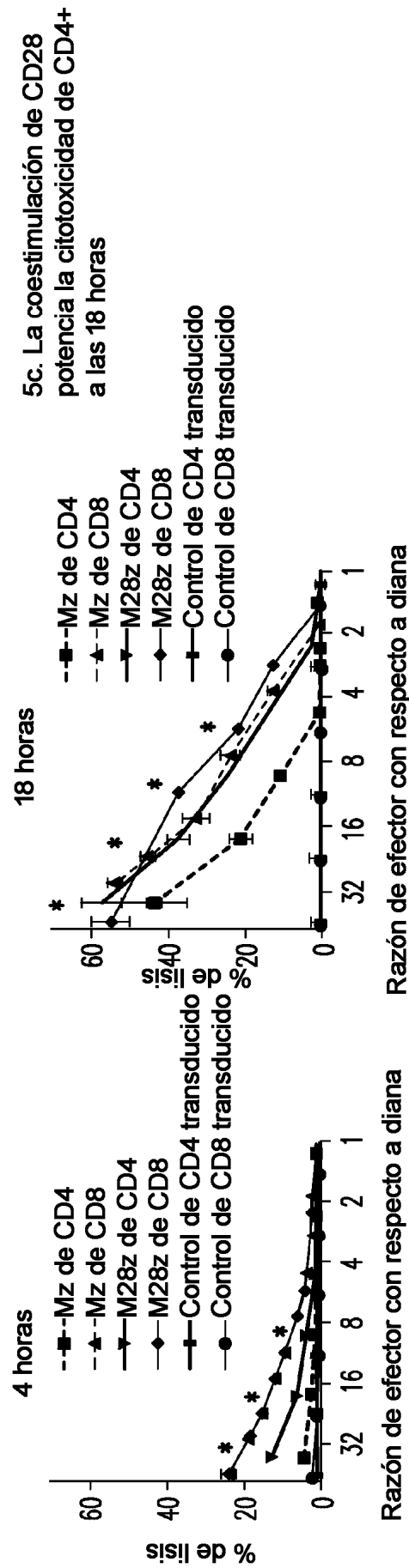


FIG. 6C

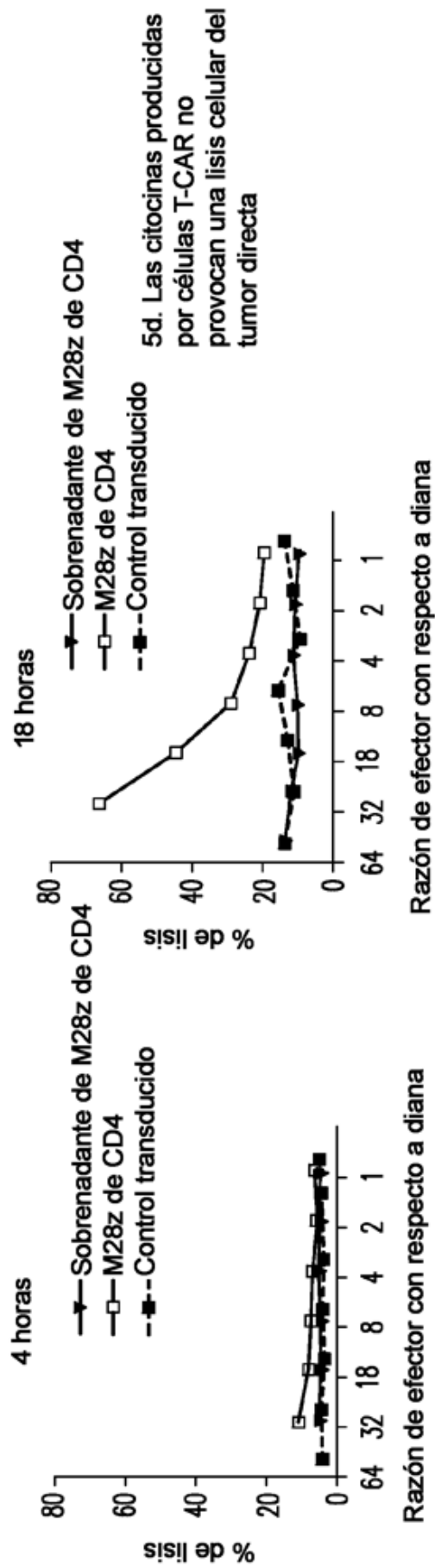


FIG. 6D

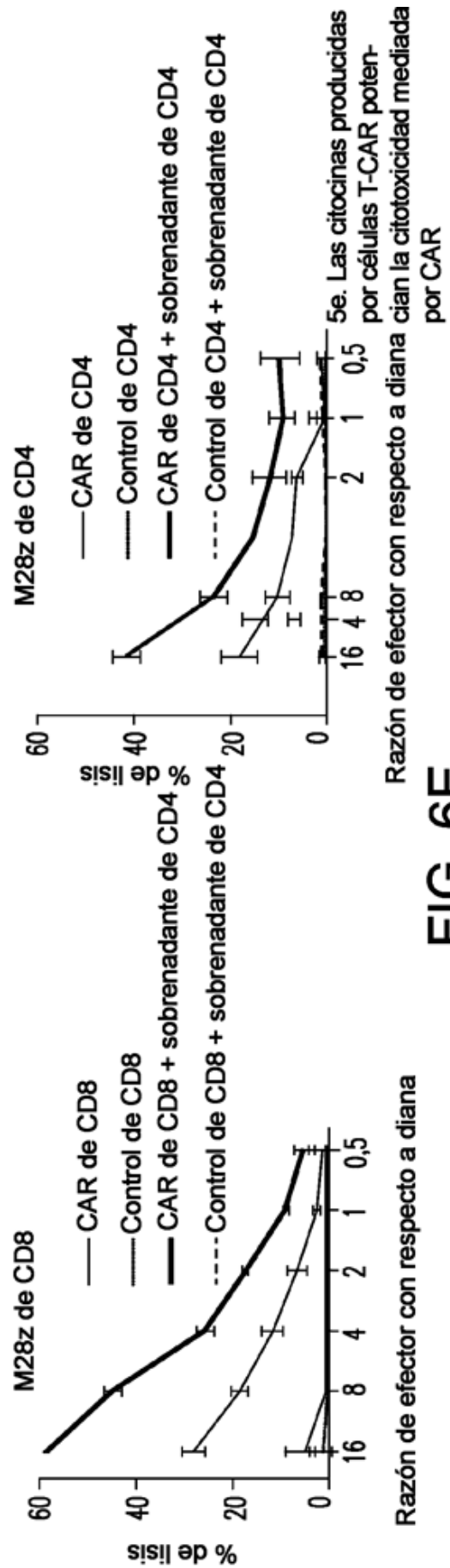
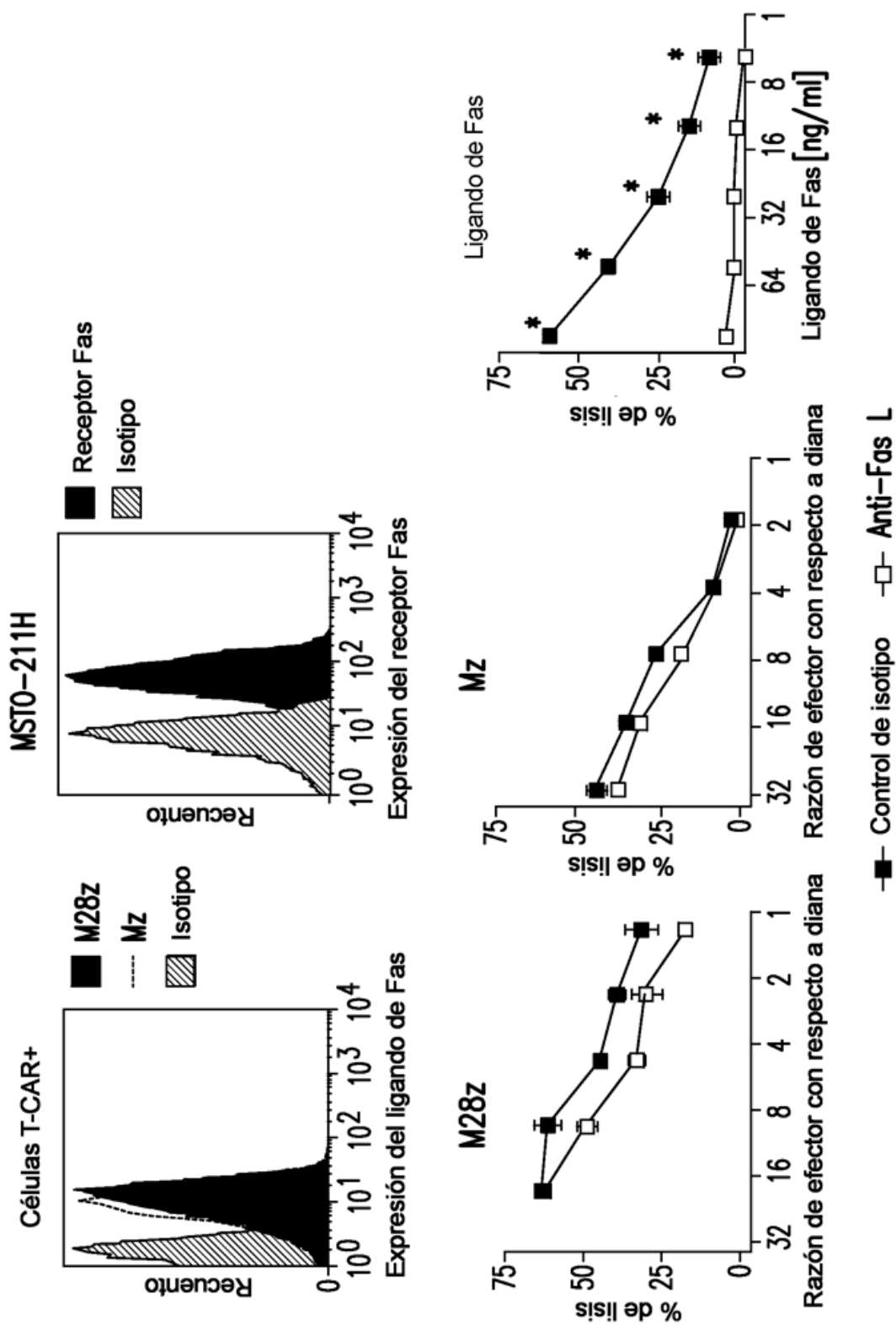
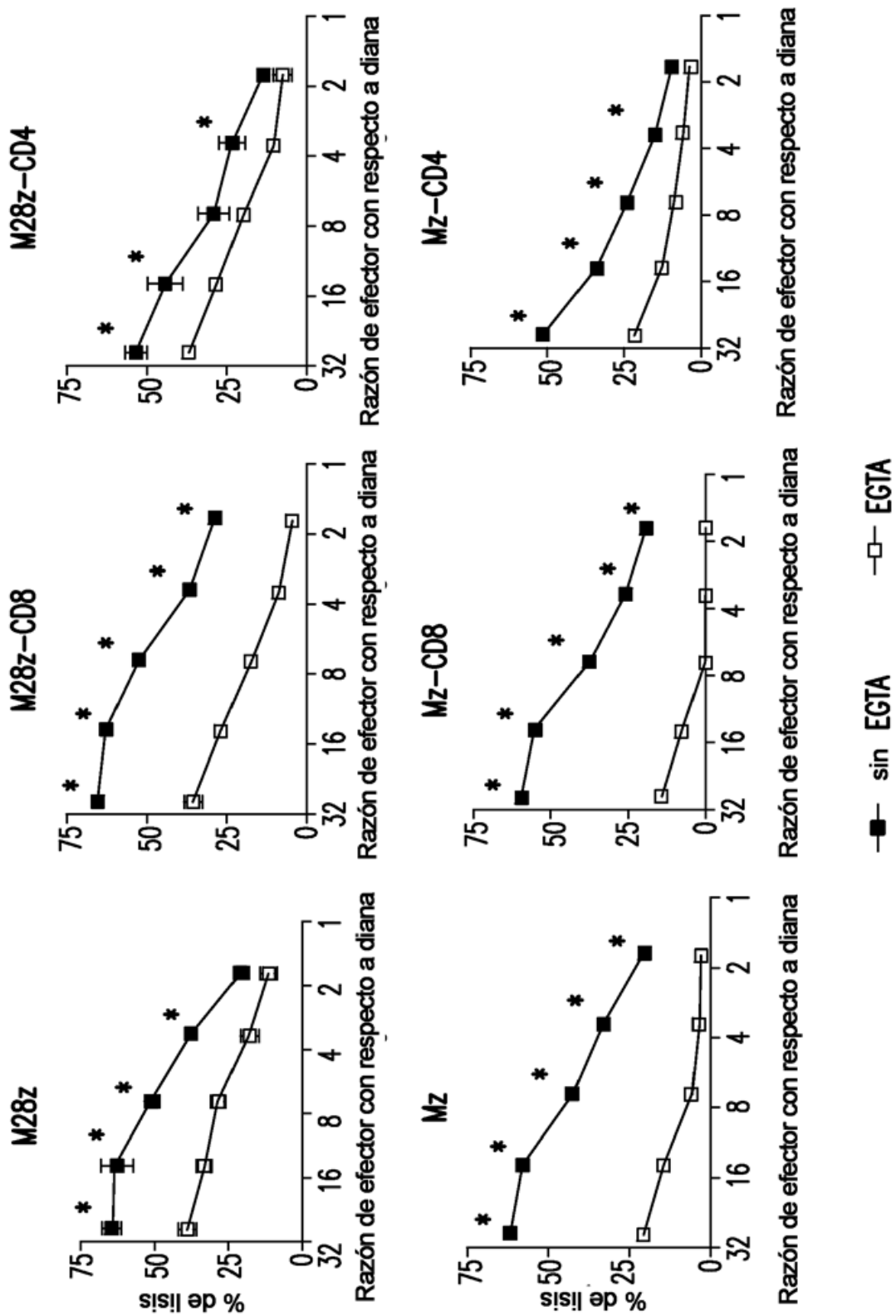


FIG. 6E



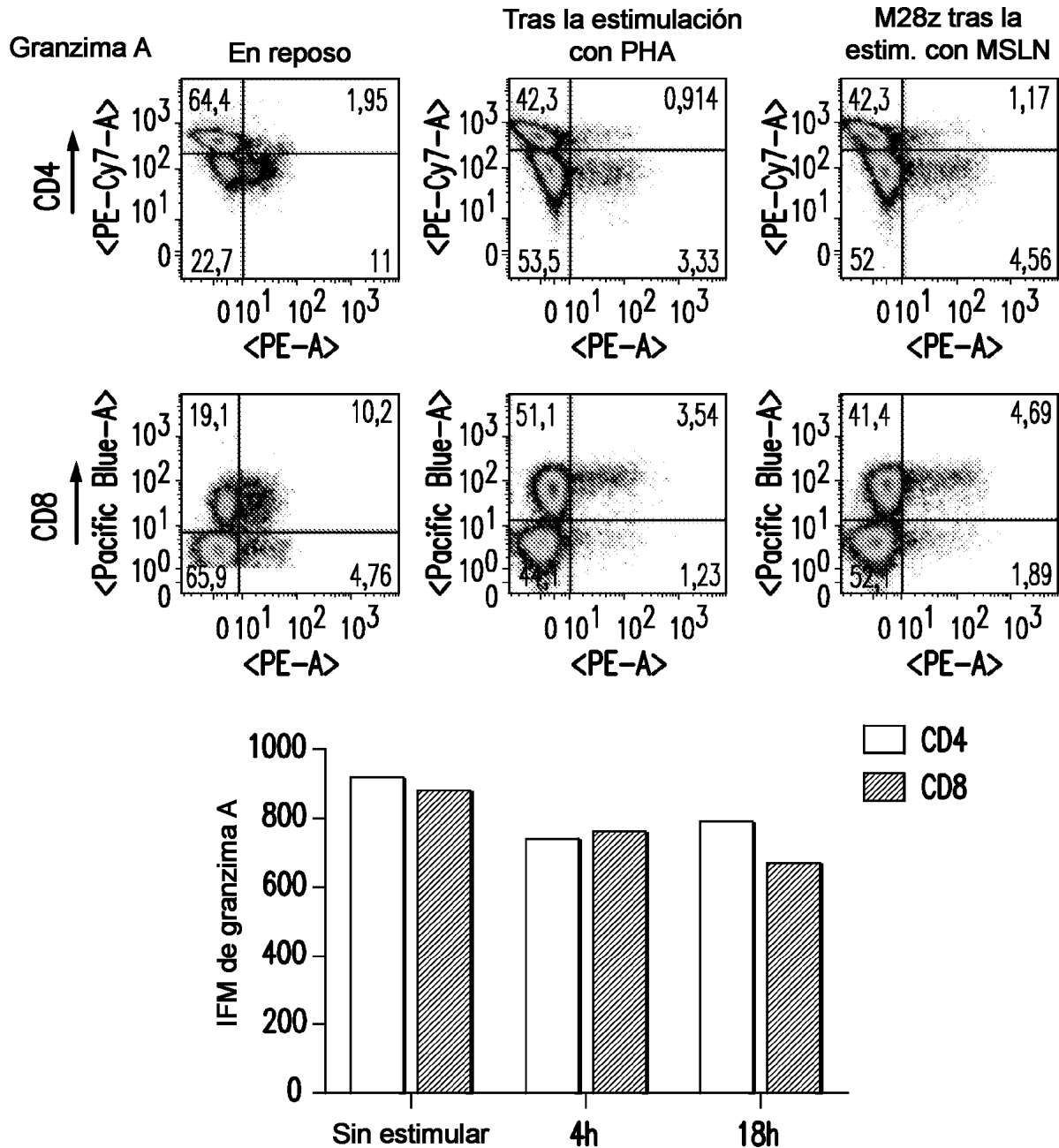
6a. Fas/FasL y las citocinas no median en la citotoxicidad de células T-CAR+

FIG. 7A



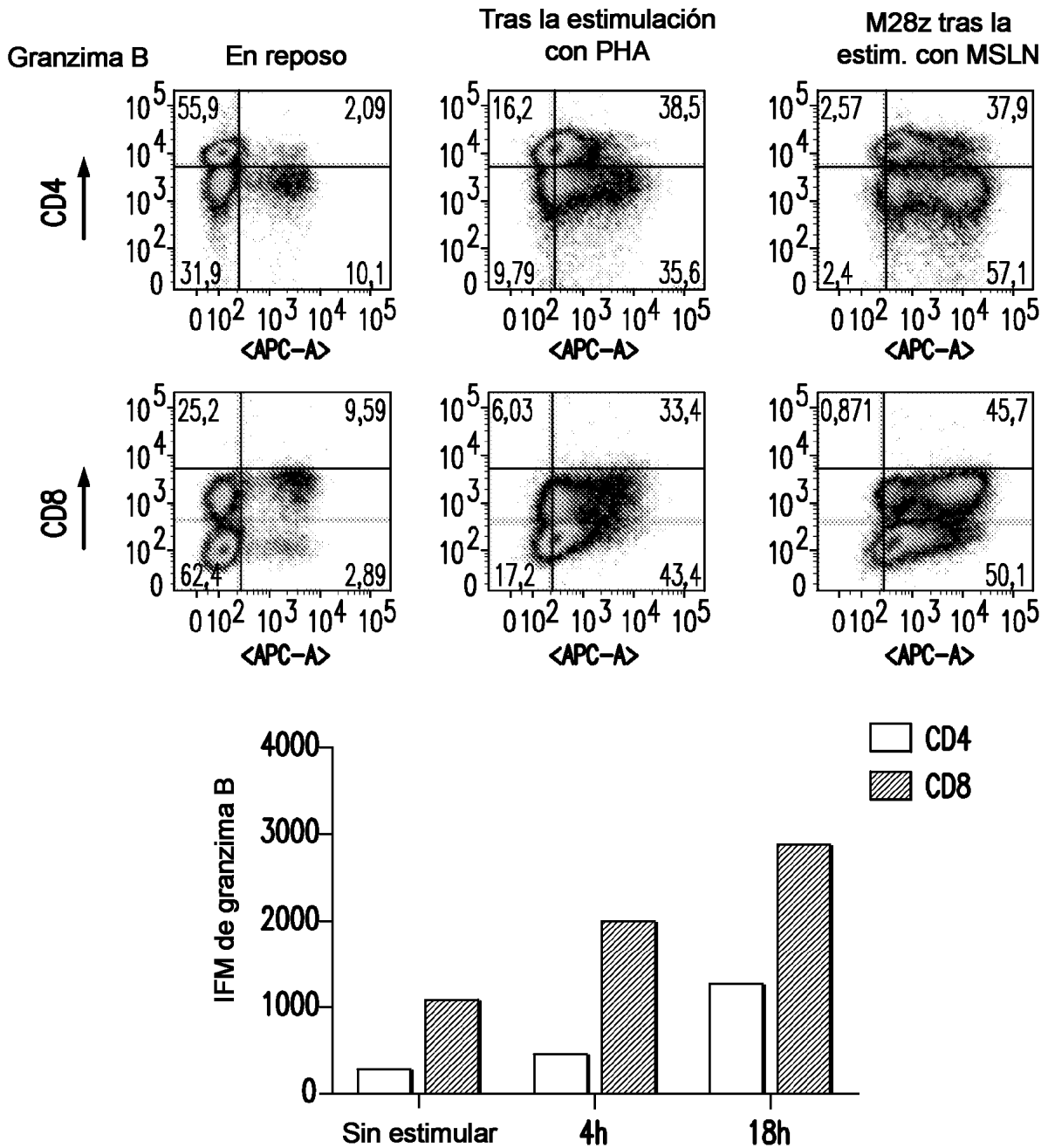
6b: La citotoxicidad de células T-CAR+ es dependiente de la ruta de granzimas/perforinas

FIG. 7B



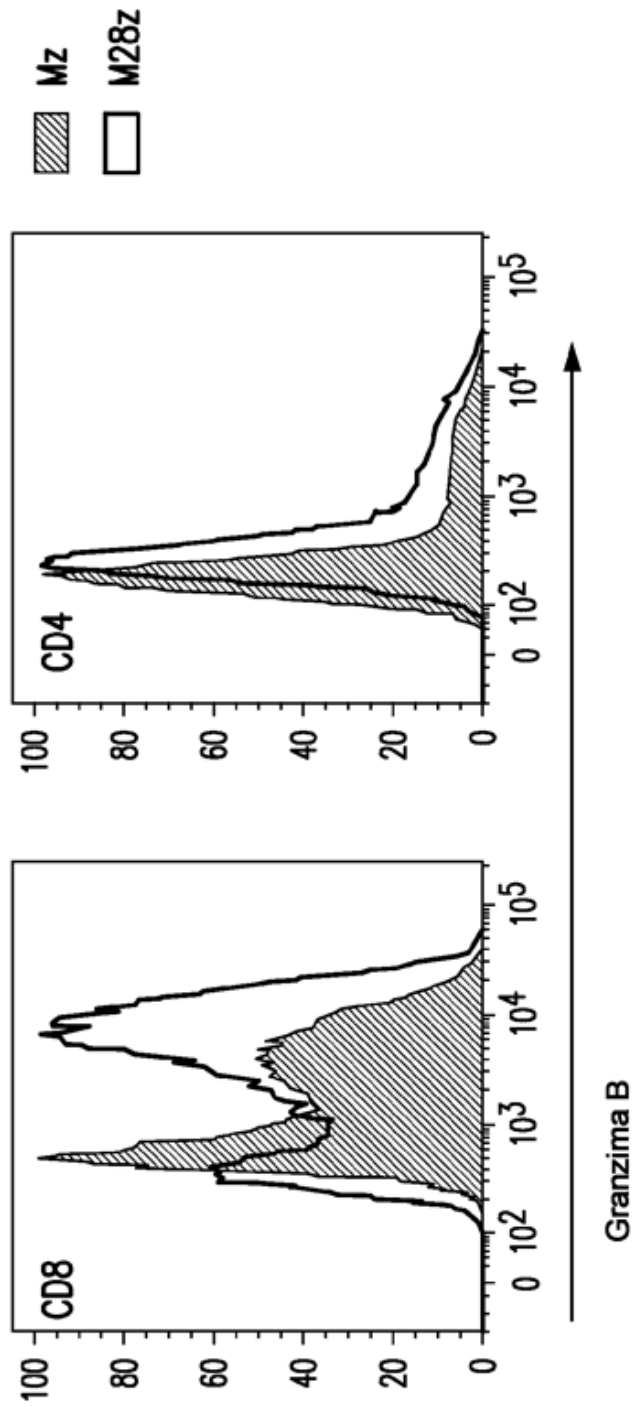
6c: Las PBMC humanas de células T CD8+ en reposo expresan las granzimas A y B. La expresión de granzimas A no se ve alterada significativamente tras la estimulación de células T-CAR+ mientras que la expresión de granzimas B puede inducirse en células T-CAR+ tanto CD4 como CD8 tras la estimulación con PHA, y se regula por incremento adicionalmente tras la estimulación con mesotelina. Las células T-CAR+ CD4+ se indujeron para regular por incremento la expresión de granzimas B con una cinética menor en comparación con células T-CAR+ CD8+

FIG. 7C



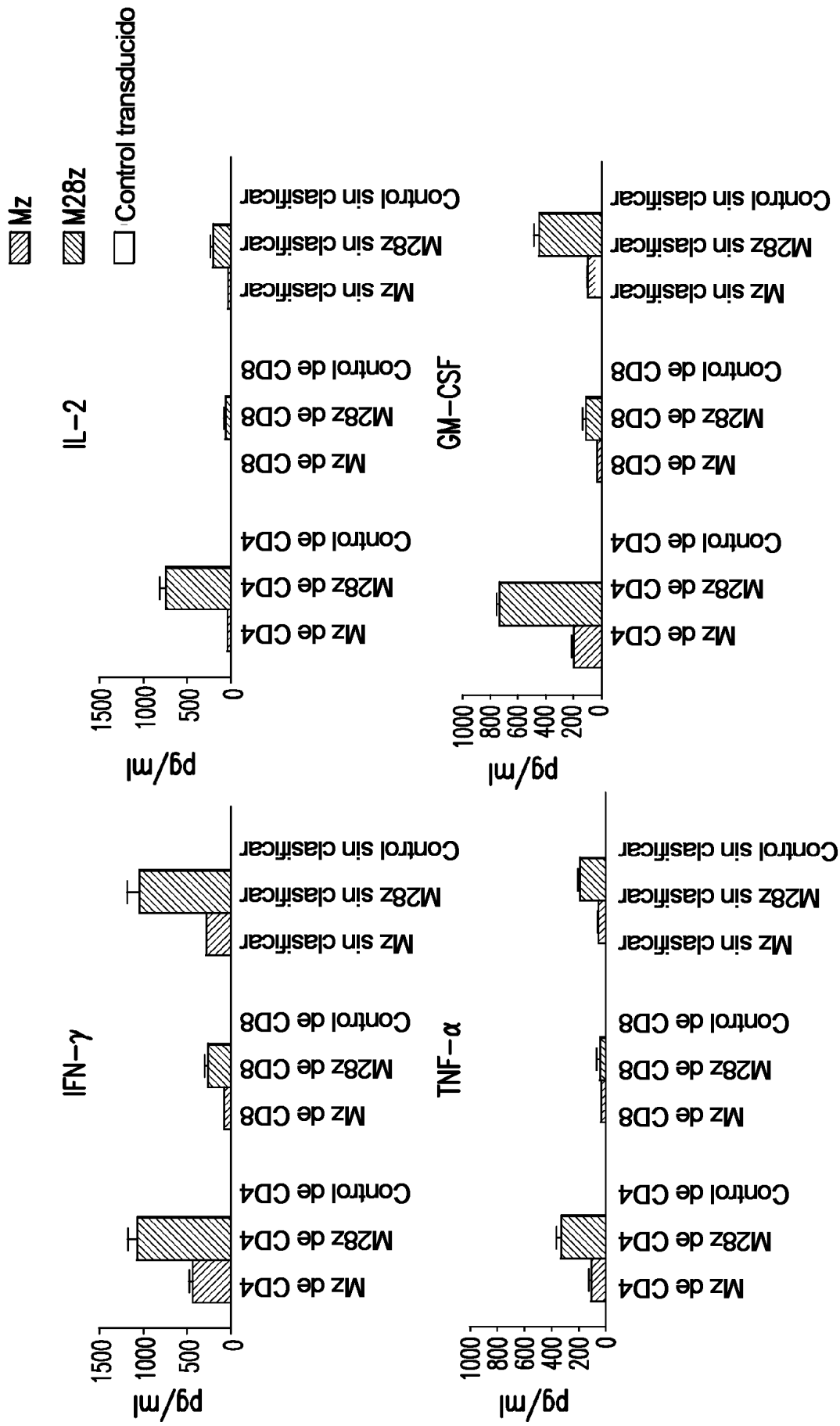
6c: Las PBMC humanas de células T CD8+ en reposo expresan las granzimas A y B. La expresión de granzimas A no se ve alterada significativamente tras la estimulación de células T-CAR+ mientras que la expresión de granzimas B puede inducirse en células T-CAR+ tanto CD4 como CD8 tras la estimulación con PHA, y se regula por incremento adicionalmente tras la estimulación con mesotelina. Las células T-CAR+ CD4+ se indujeron para regular por incremento la expresión de granzimas B con una cinética menor en comparación con células T-CAR+ CD8+

FIG. 7C continuación



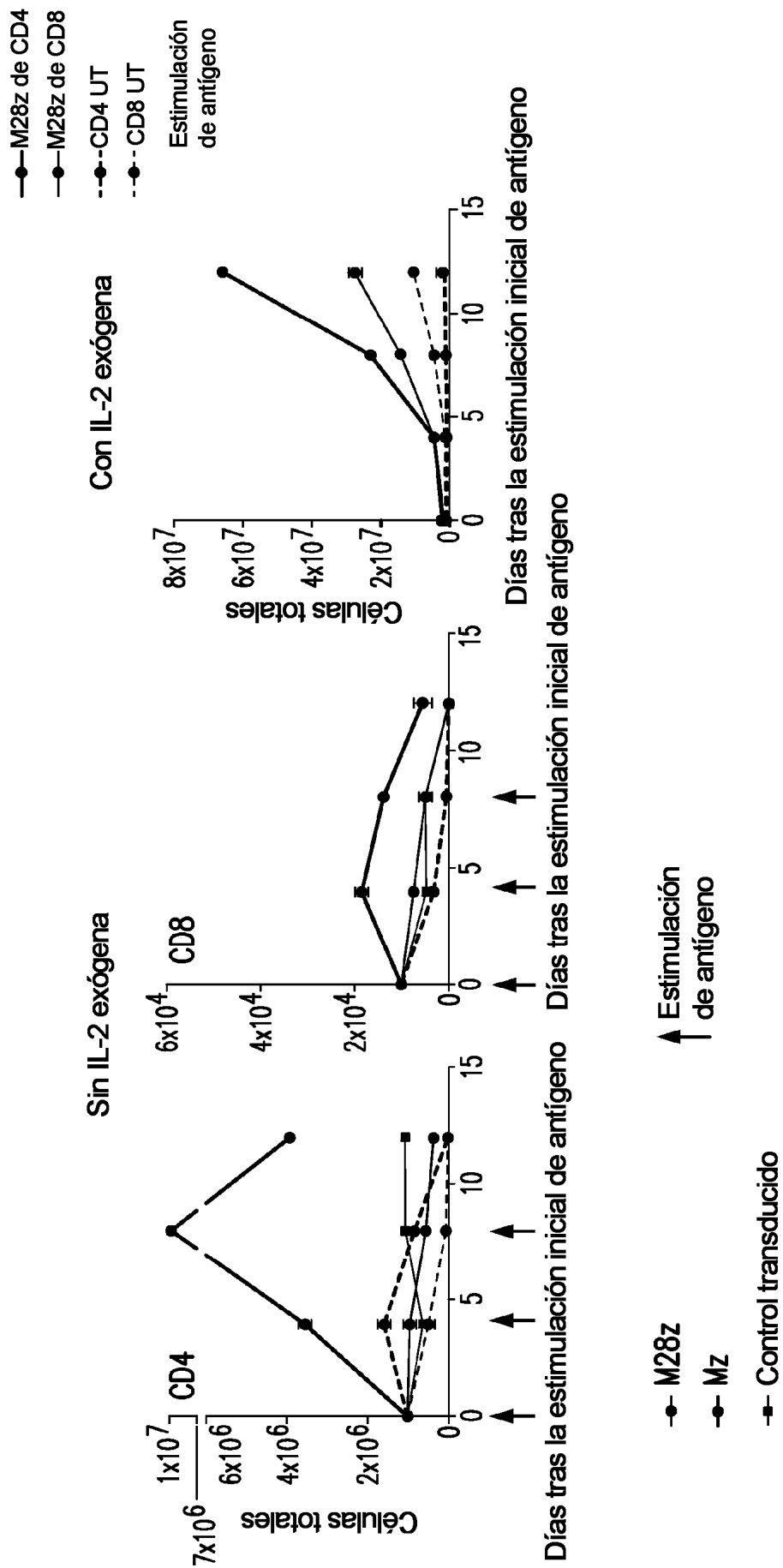
6d: Tanto CD4 como CD8 con células T-CAR de M28z expresan una mayor cantidad de granzima B en comparación con Mz

FIG. 7D



7a: La coestimulación de CD28 potencia la secreción de citocinas de células T CAR+ CD4 y CD8

FIG. 8A



7b: Las células T CD4 con coestimulación de CD28 proliferan *in vitro* hasta un mayor grado en comparación con células T CD8 M28z

FIG. 8B

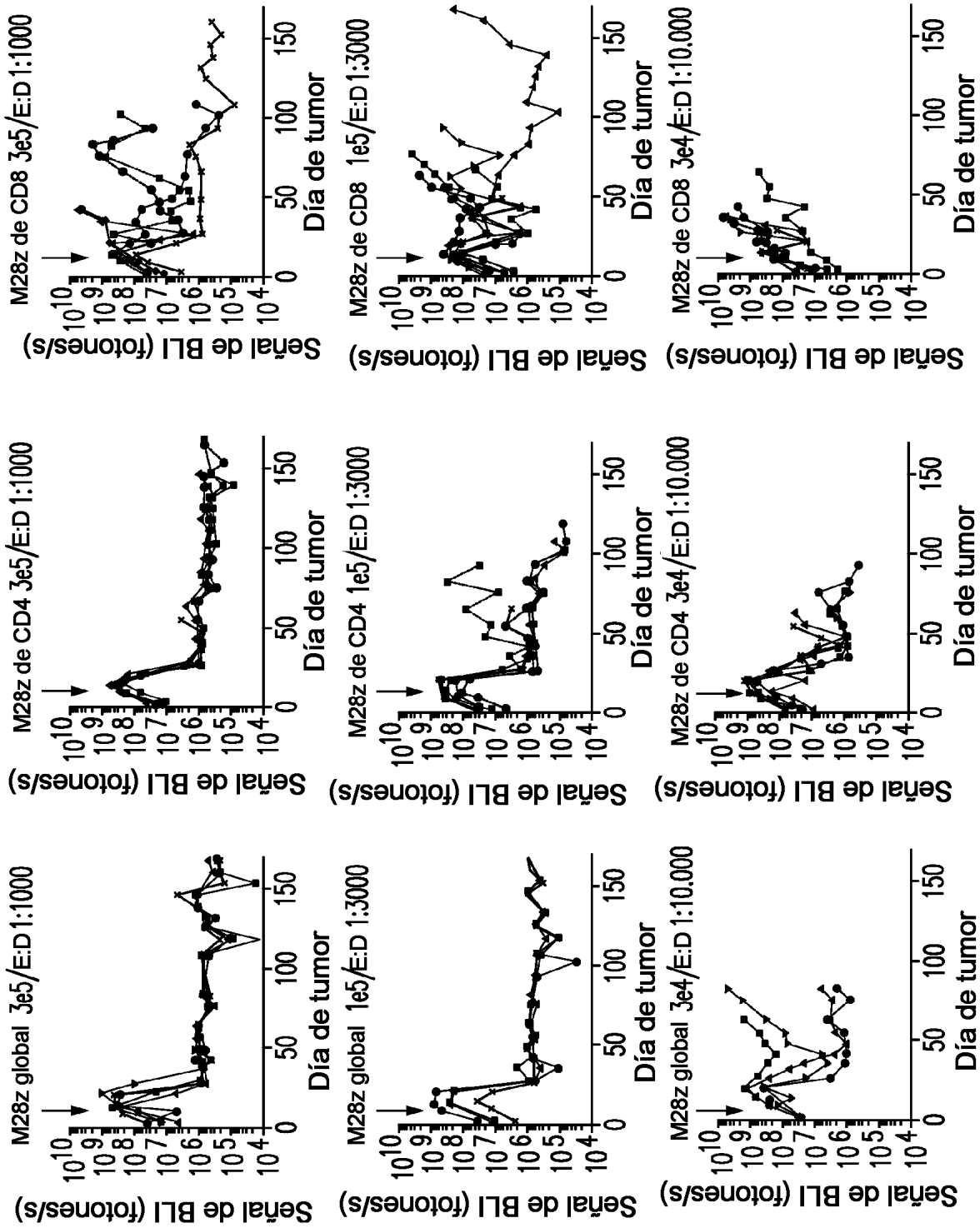


FIG. 9A

Las células T-CAR CD4 M28z son eficaces solas *in vivo* y median en la eficacia potenciada en comparación con células T-CAR CD8 M28z

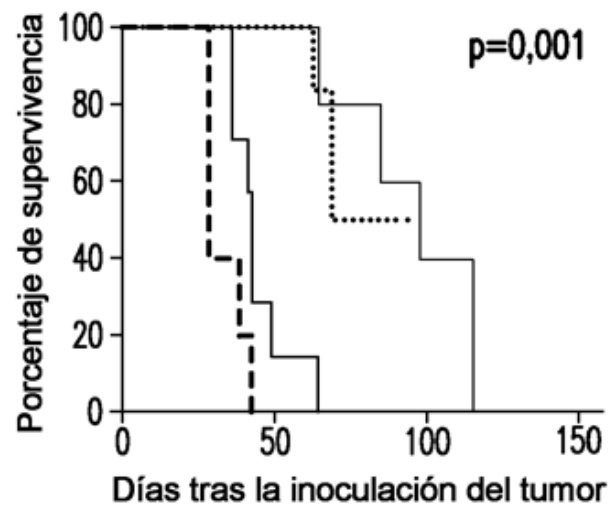
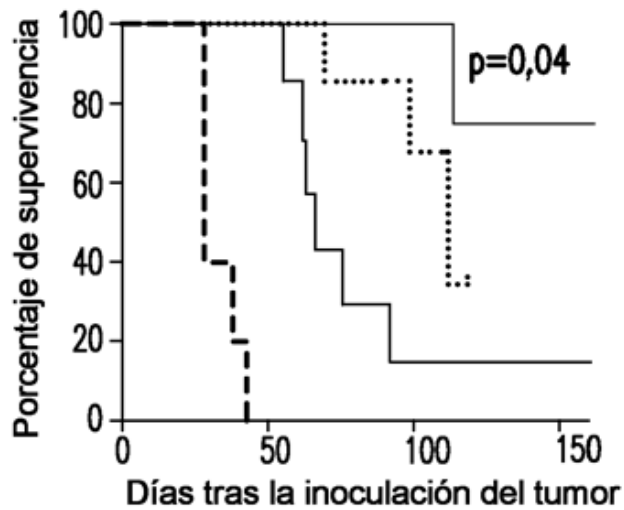
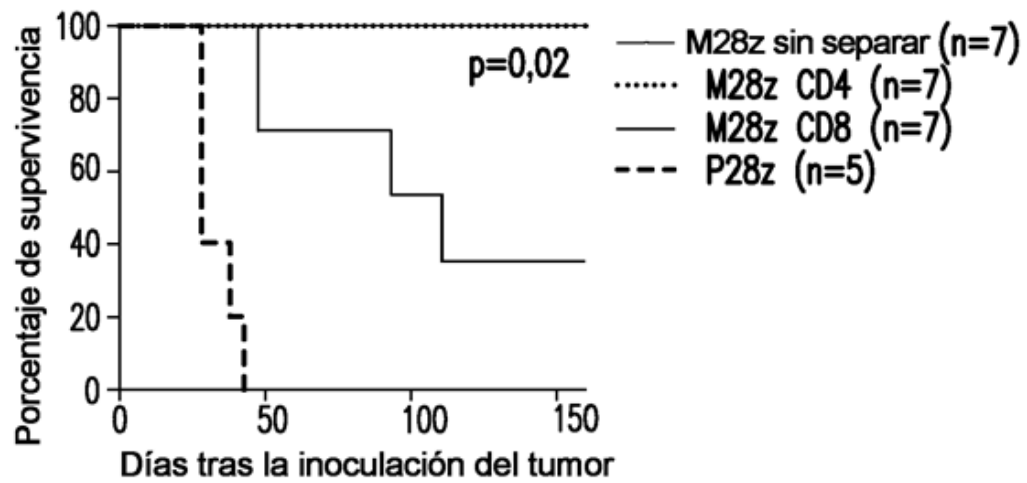


FIG. 9B

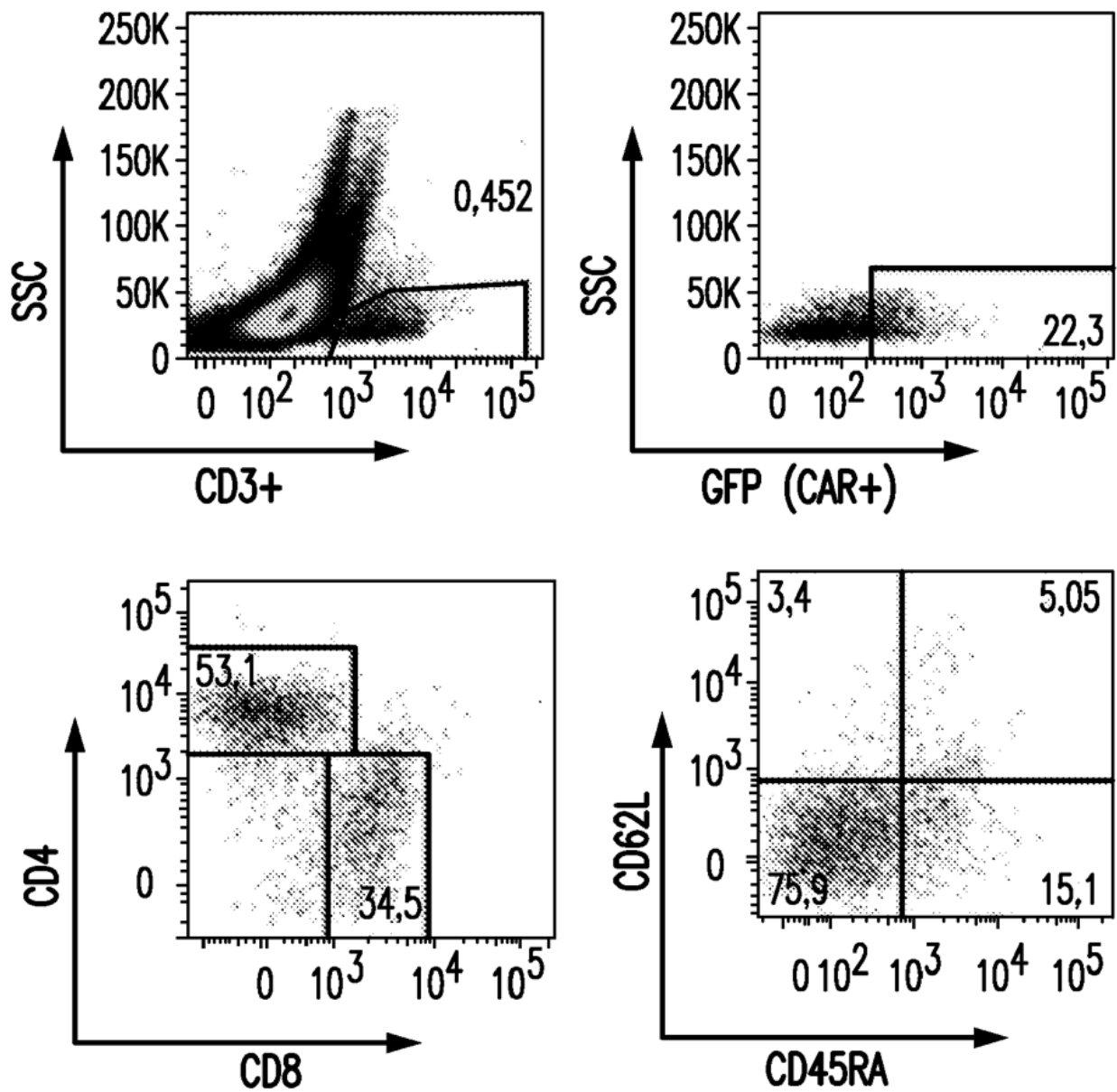


FIG. 10A

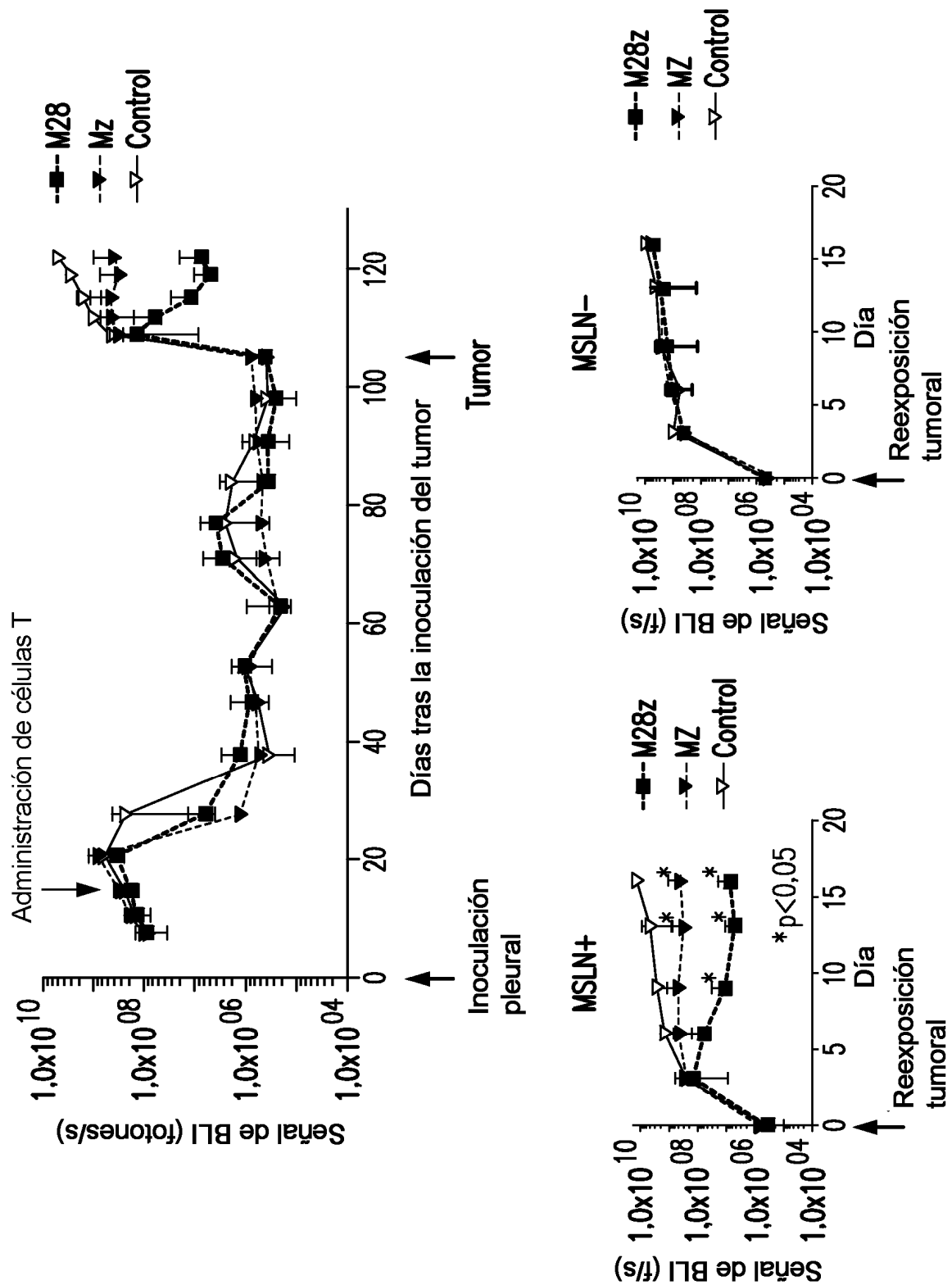


FIG. 10B

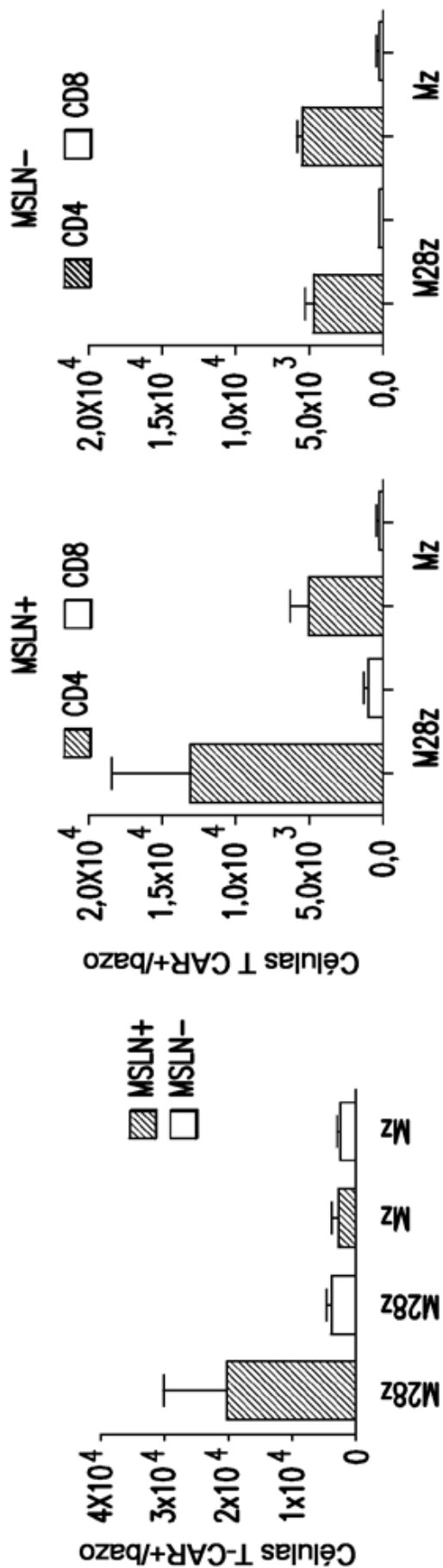


FIG. 10C

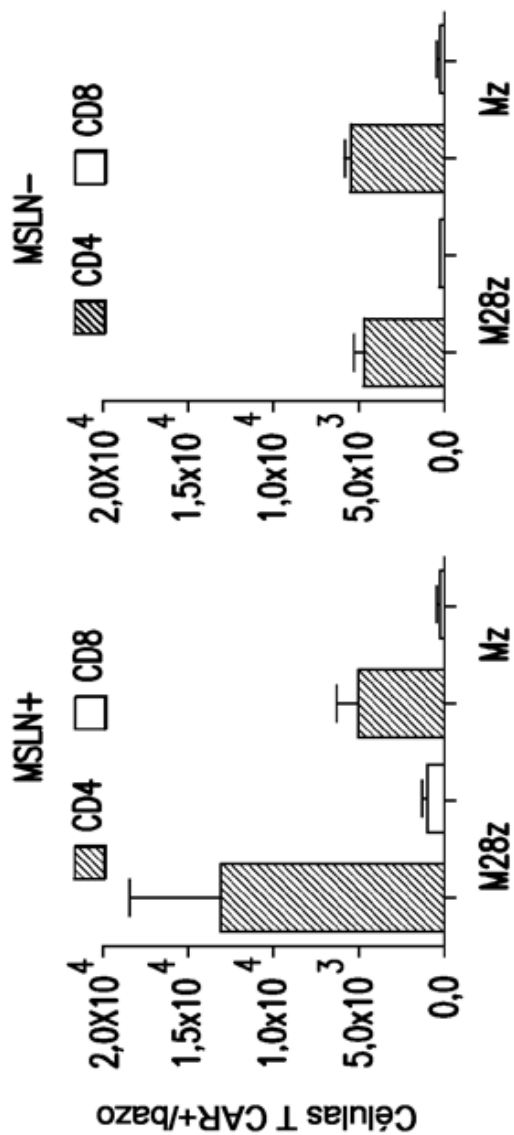


FIG. 10D

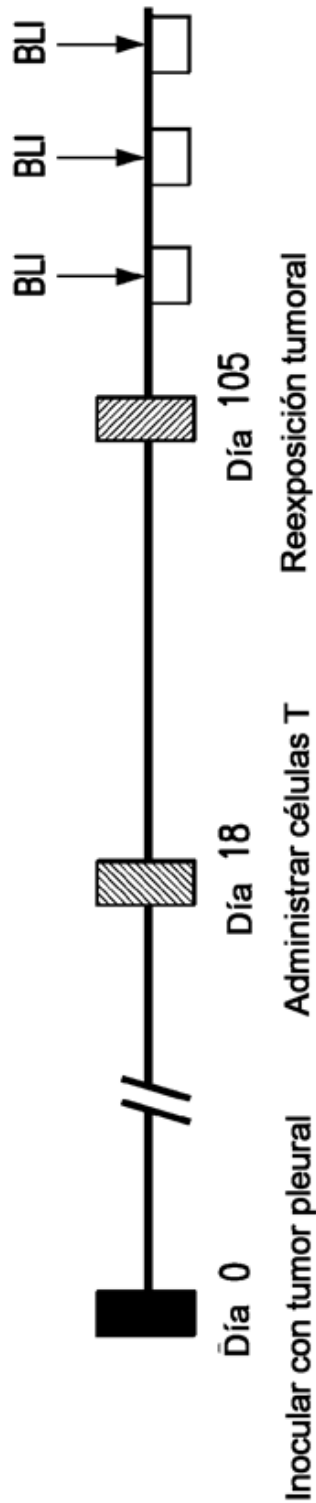


FIG. 10E

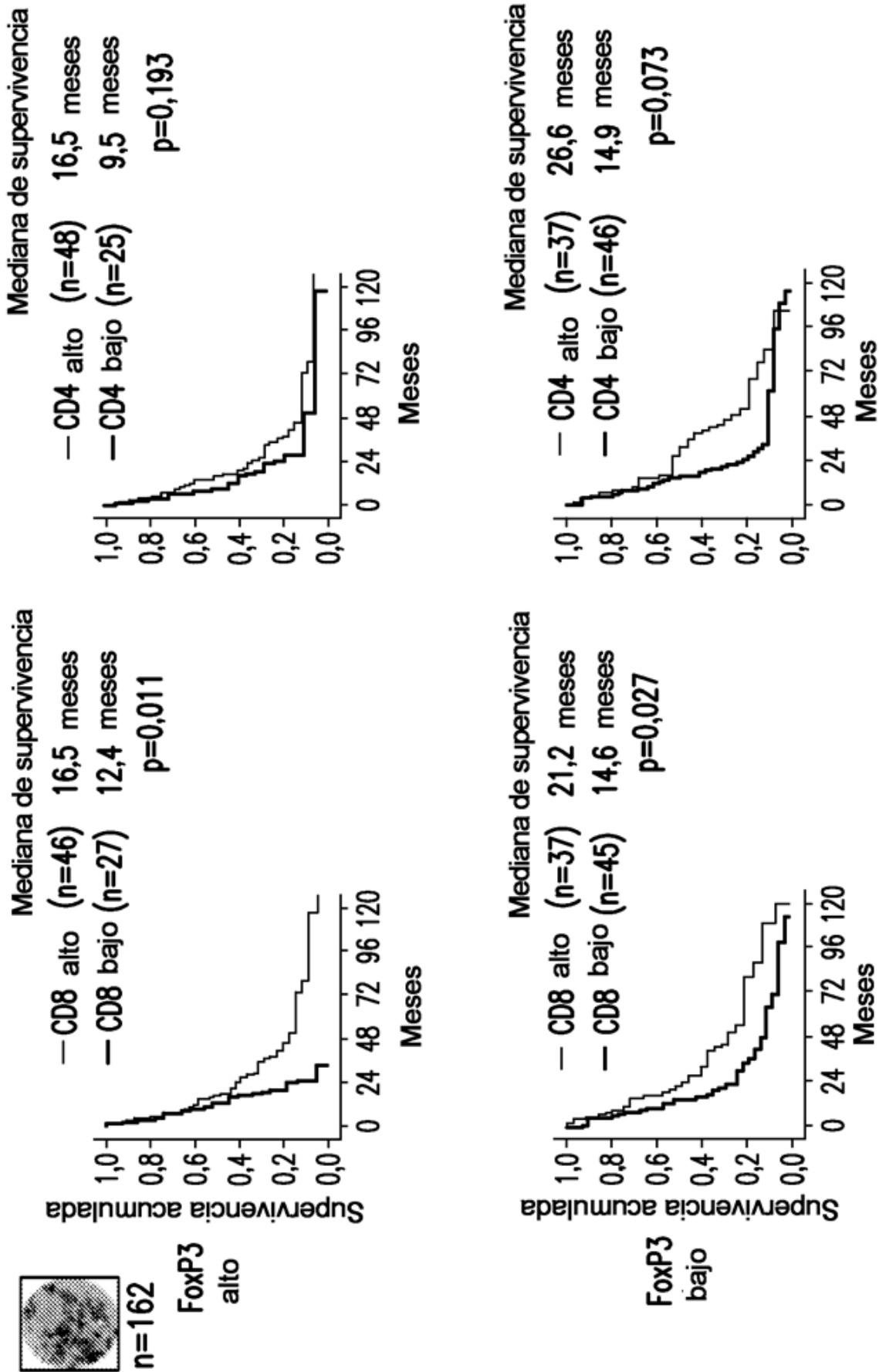


FIG. 11A

La infiltración estromal de células T de CD4 alto prolonga la supervivencia en presencia de FoxP3

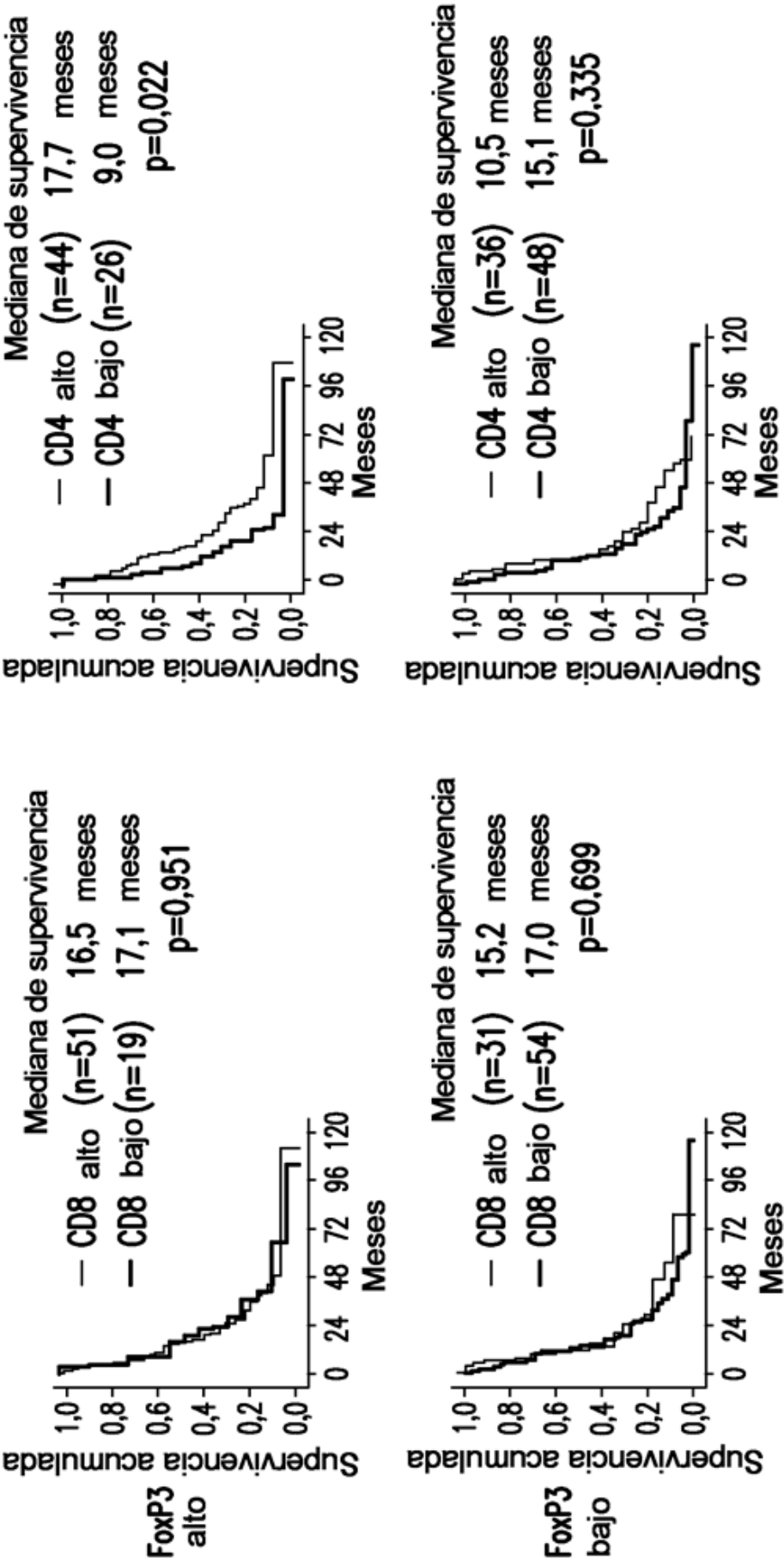
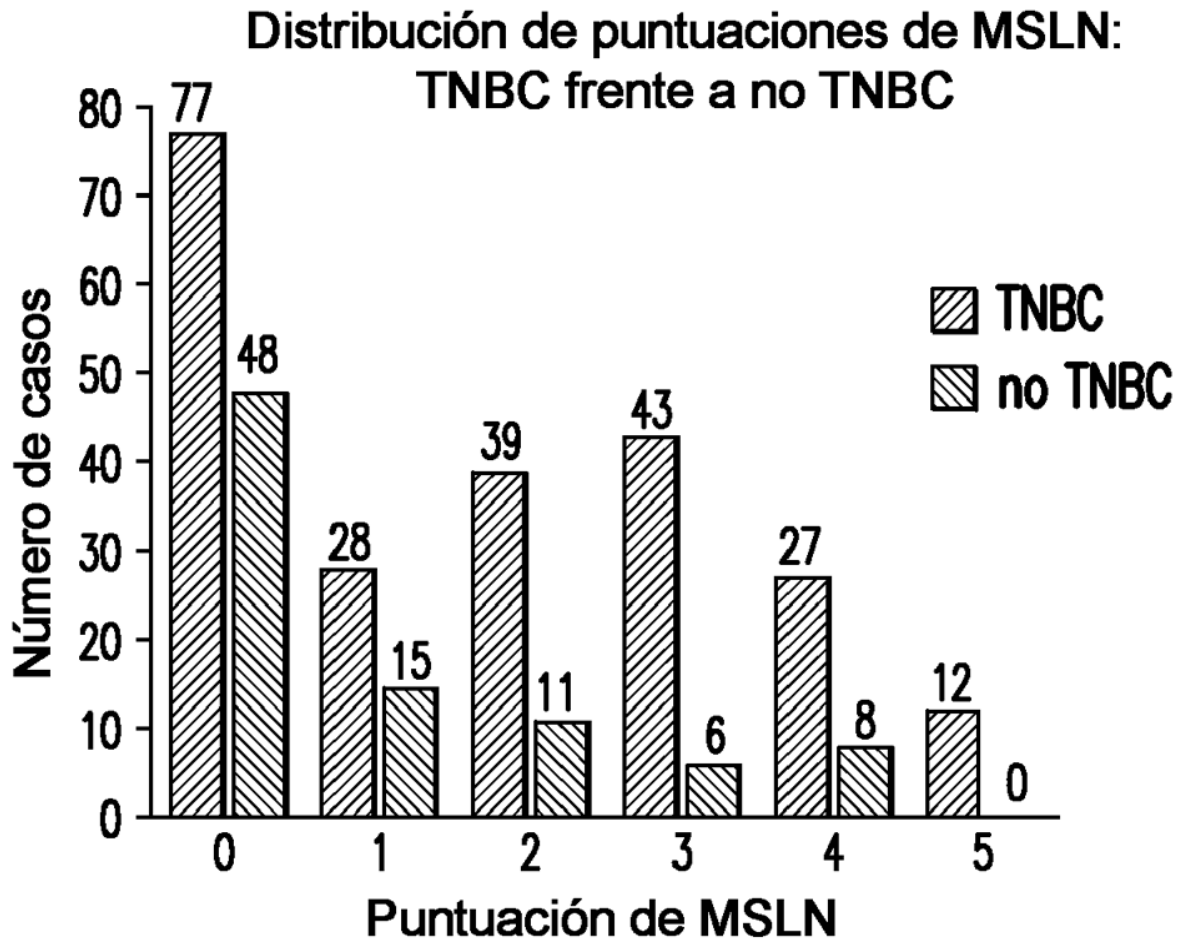


FIG. 11B

**FIG. 12**

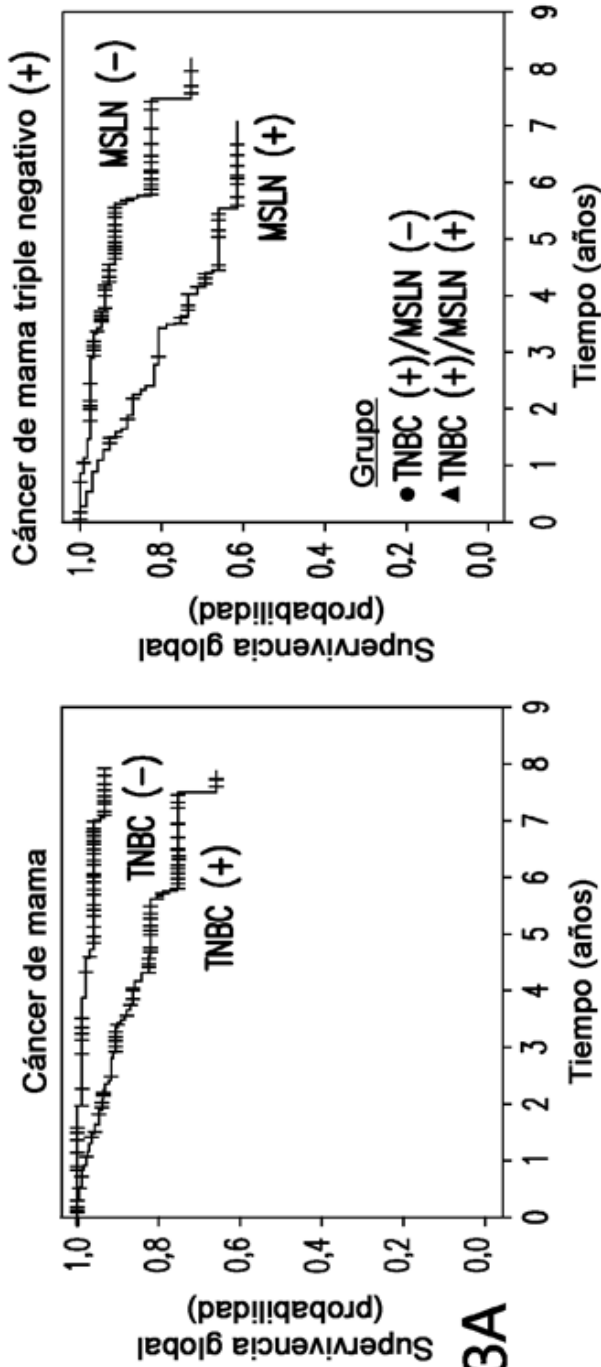


Gráfico de supervivencia global que compara TNCa negativo para mesotelina, TNCa positivo para mesotelina y controles de tumor.

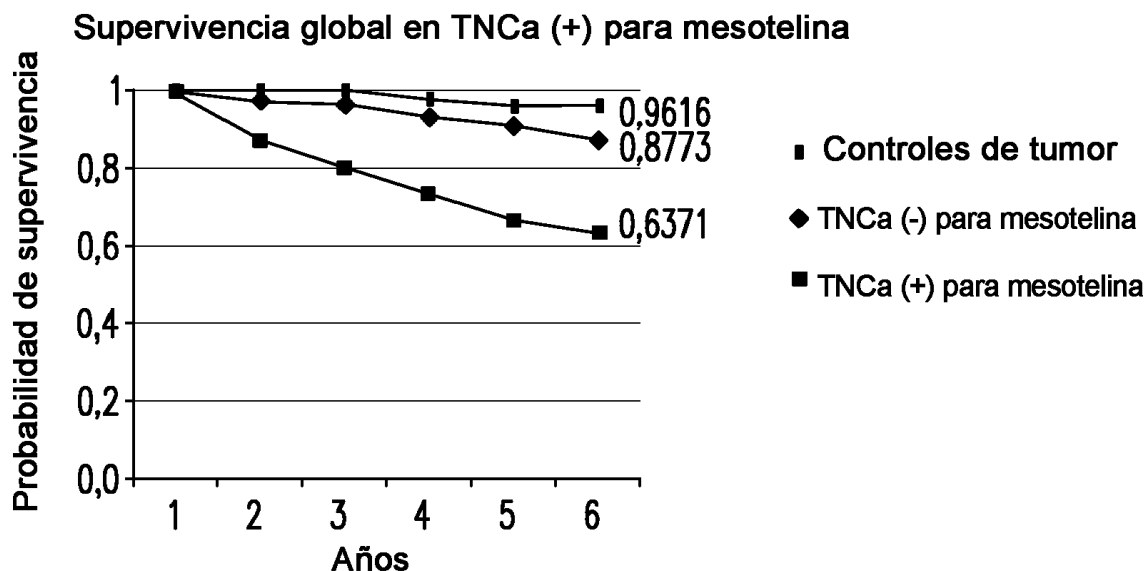


FIG. 13E

Gráfico de supervivencia específica de enfermedad que compara TNCa negativo para mesotelina, TNCa positivo para mesotelina y controles de tumor (DOD)

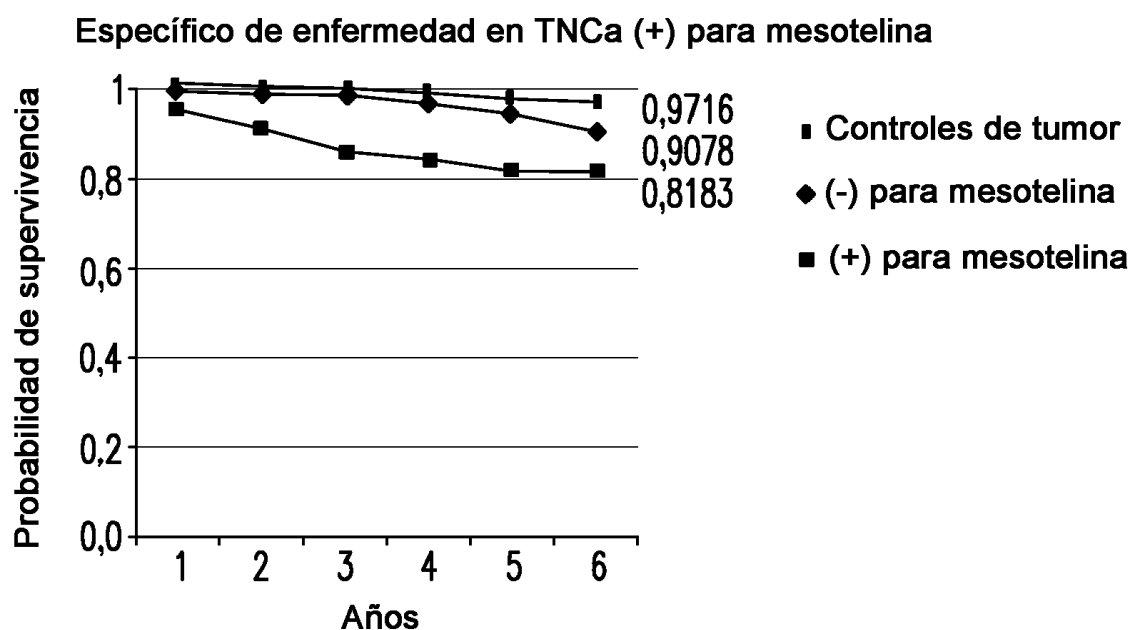


FIG. 13F

Niveles de SMRP preop. medidos en los sueros
de pacientes con ADC de pulmón en estadio I
(N=69)

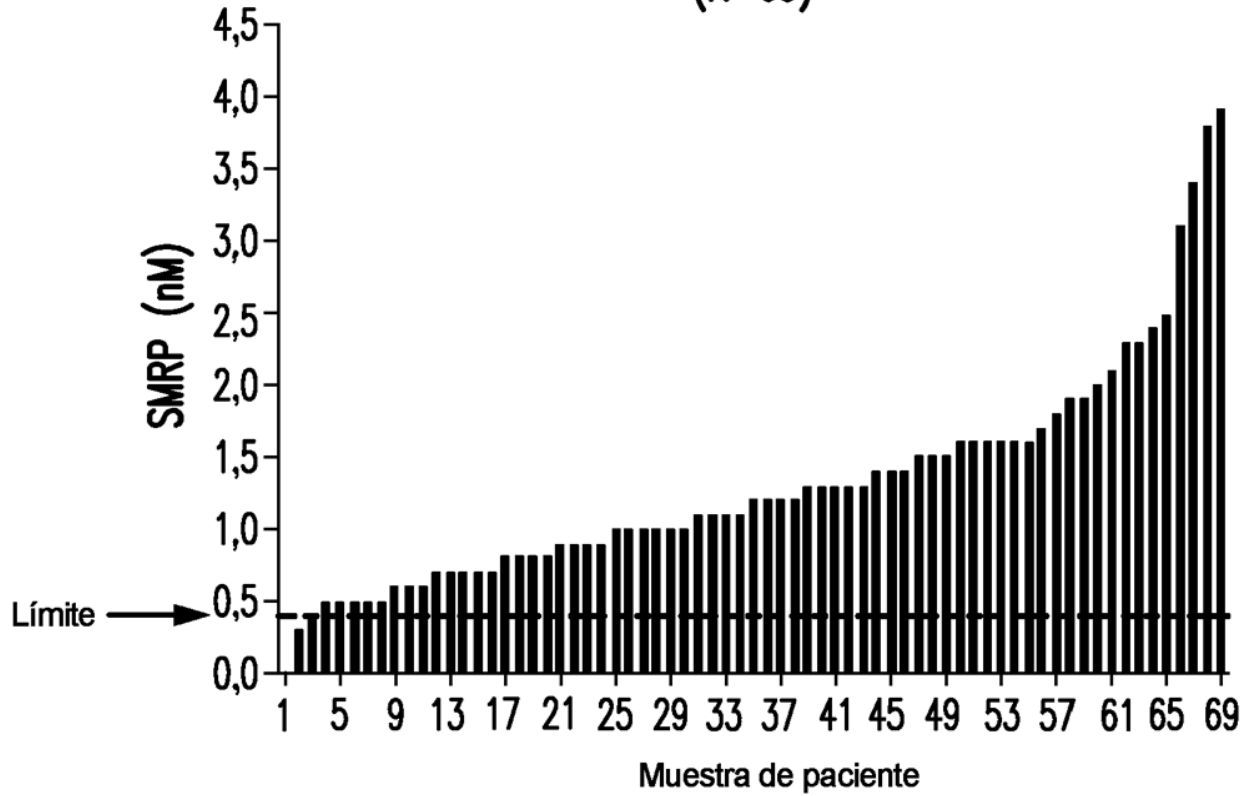


FIG. 14

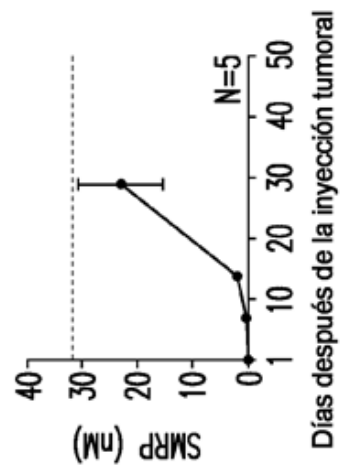
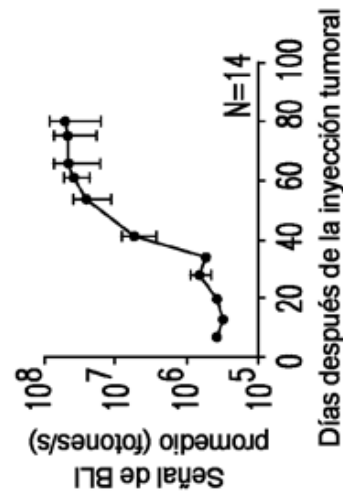
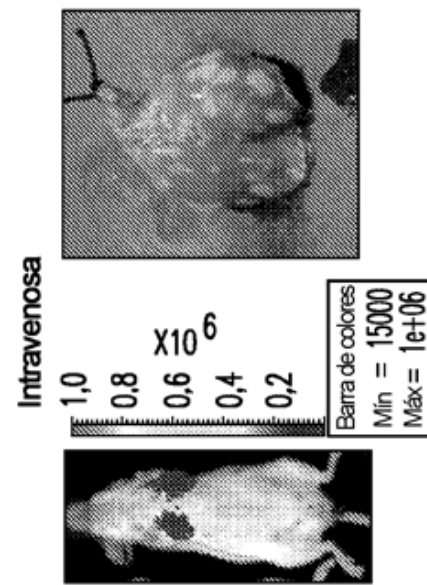


FIG. 15C

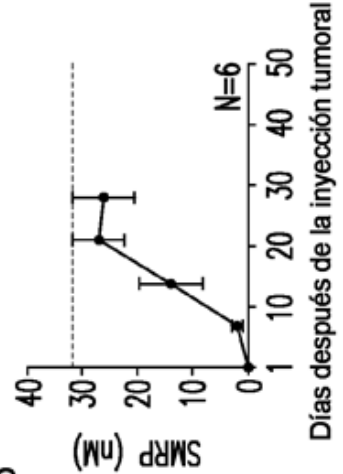
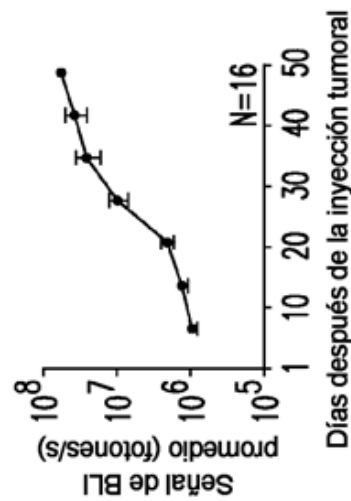
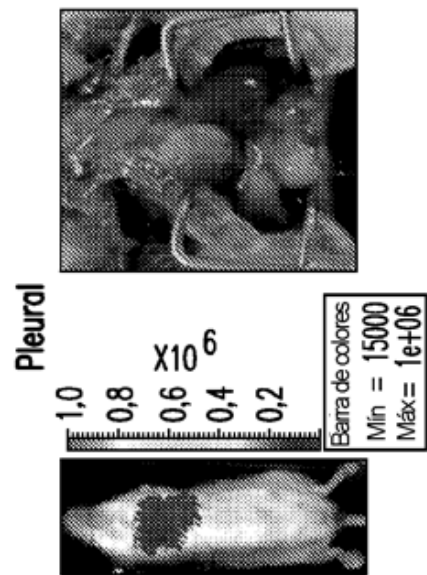
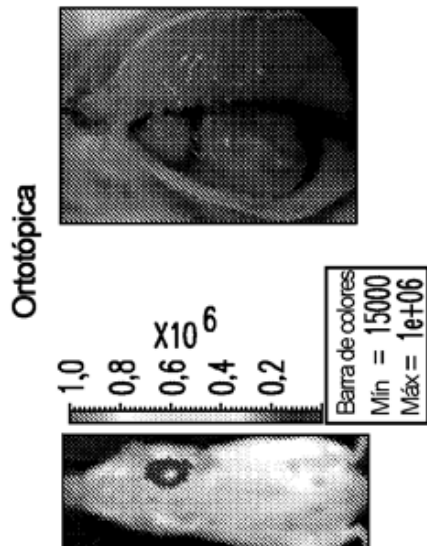
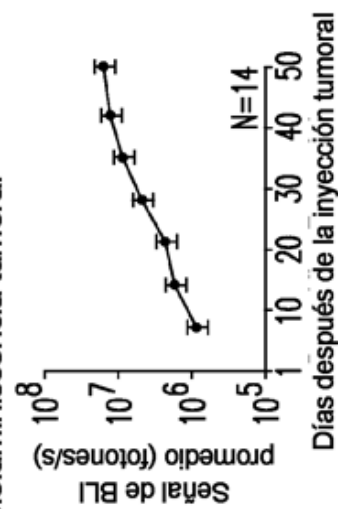


FIG. 15B



Bioluminiscencia tumoral



Proteína relacionada con mesotelina en suero

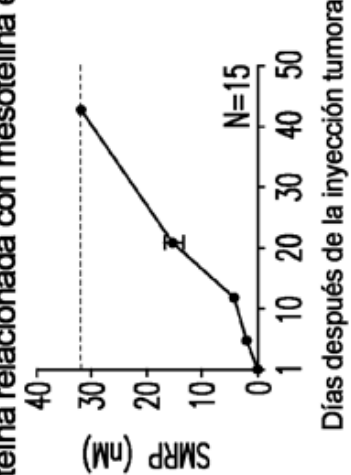


FIG. 15A

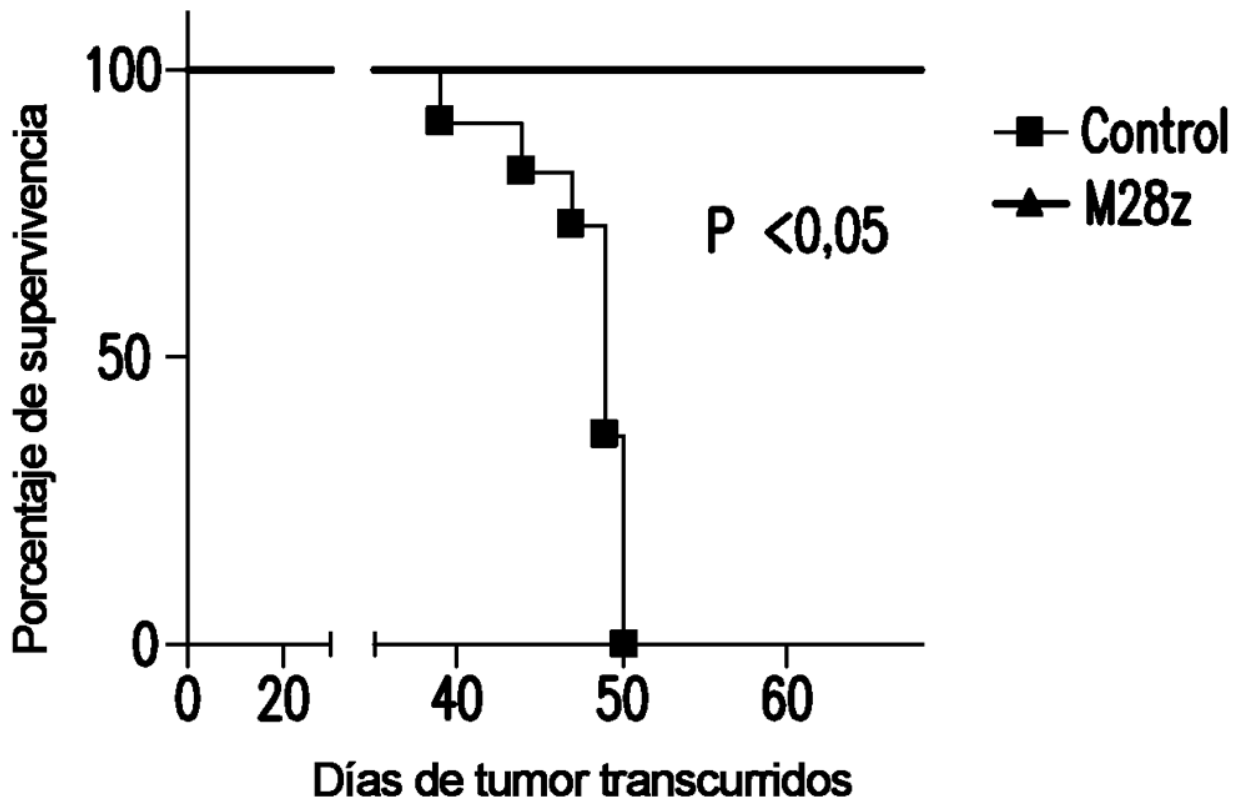


FIG. 16

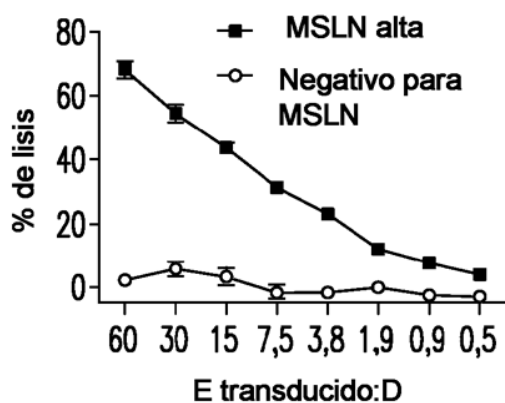


FIG. 17A

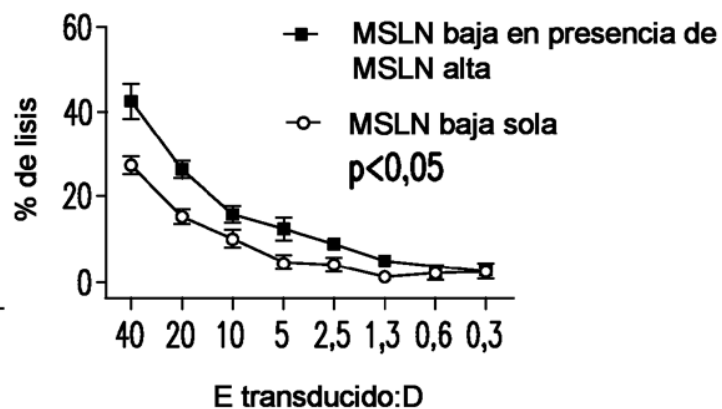


FIG. 17B

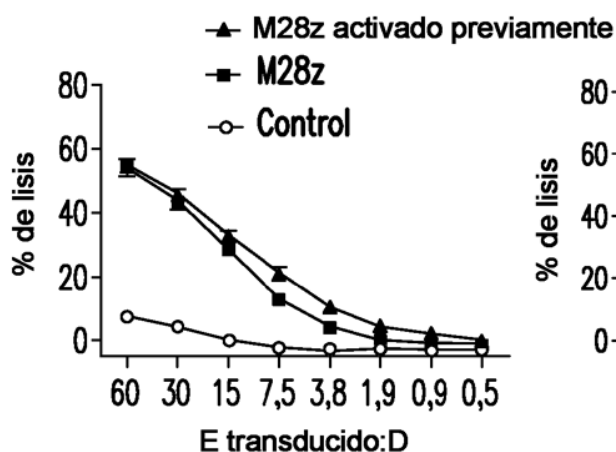


FIG. 17C

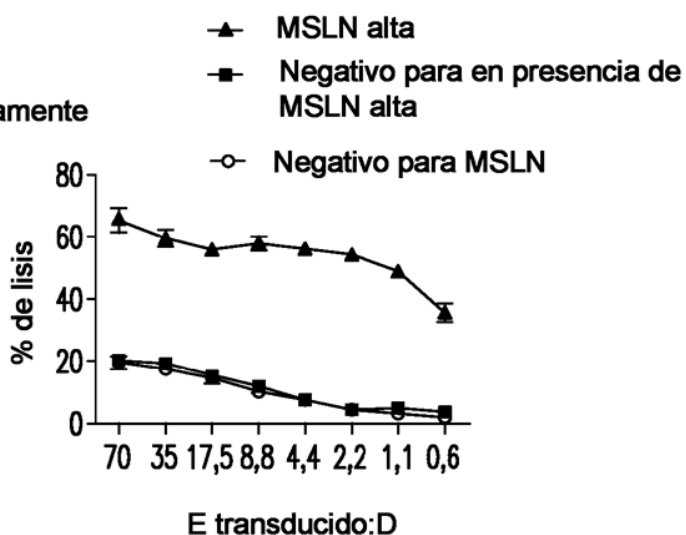


FIG. 17D

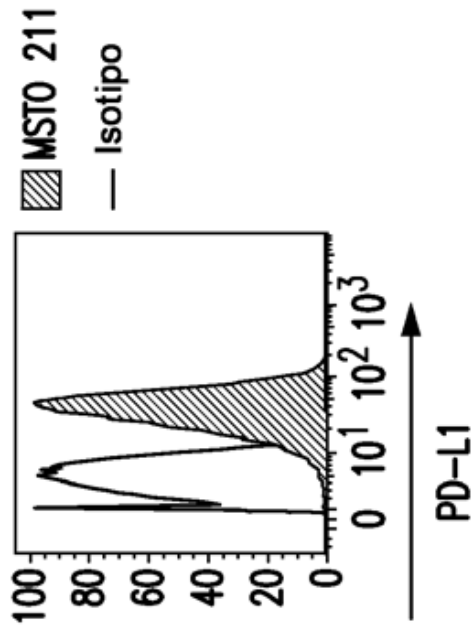


FIG. 18

MBBz

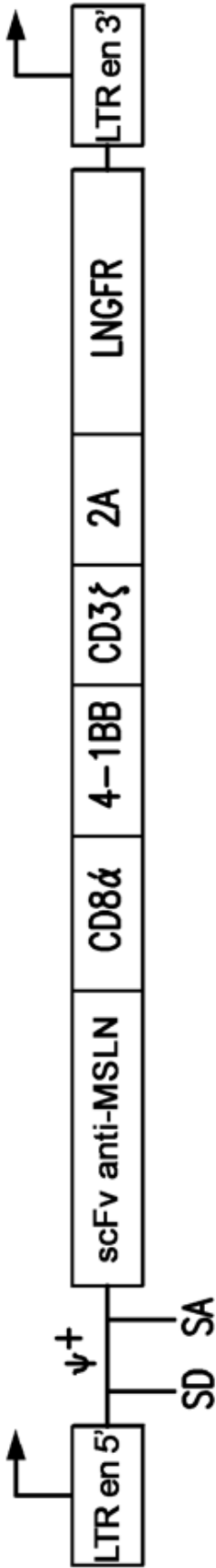


FIG. 19

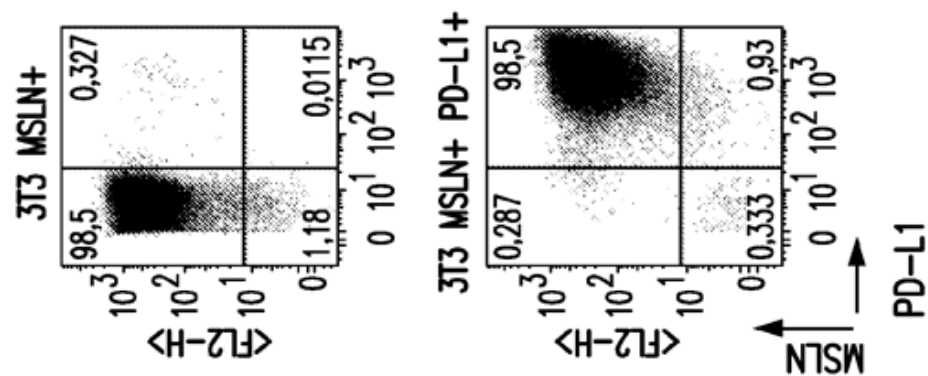


FIG. 20A

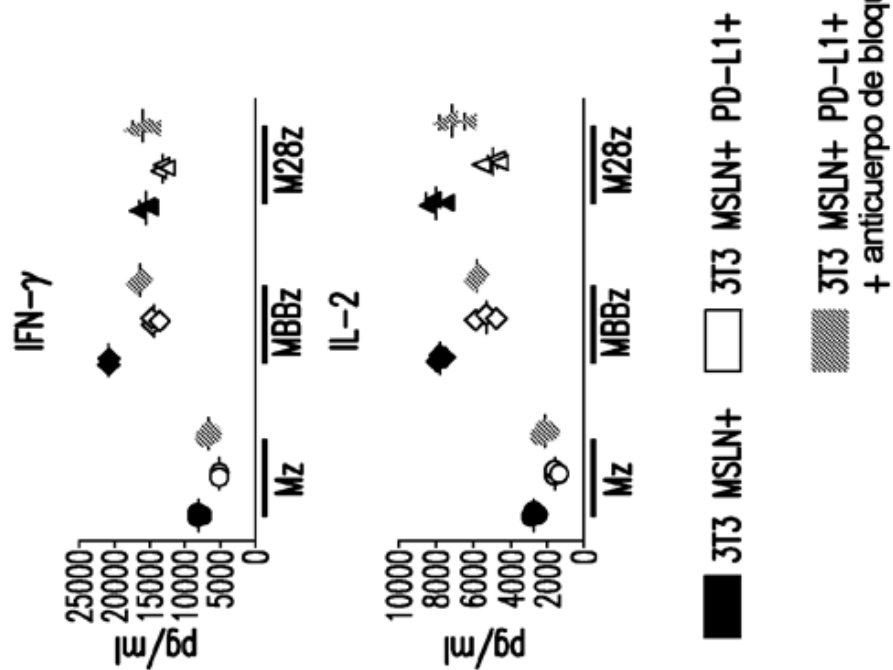


FIG. 20B

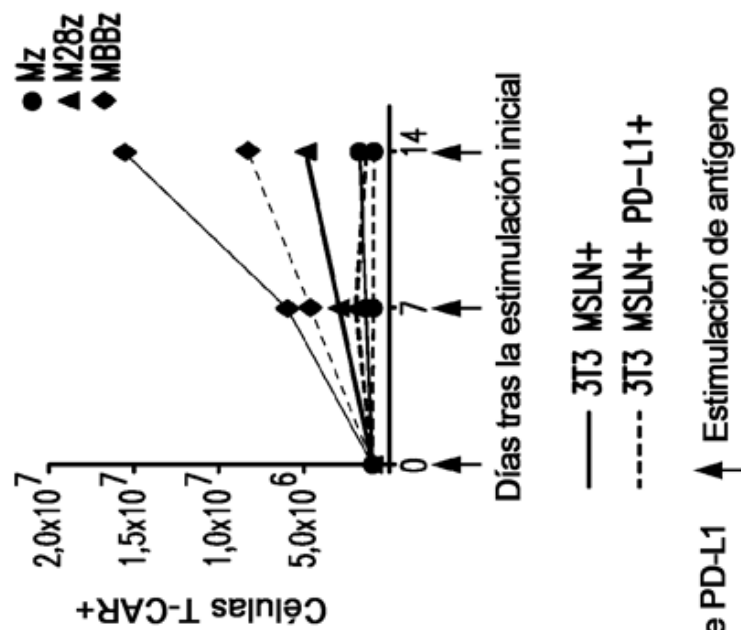
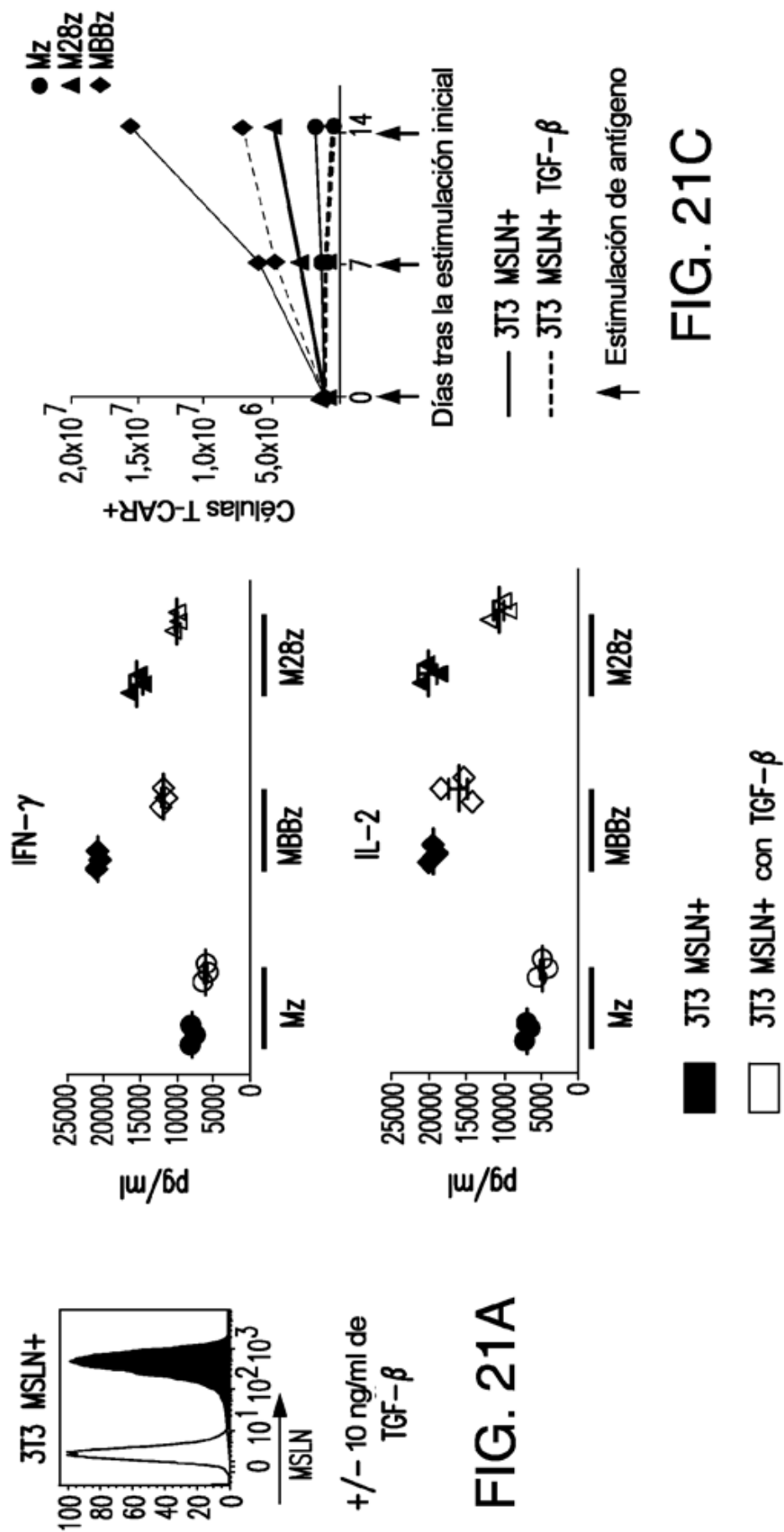


FIG. 20C



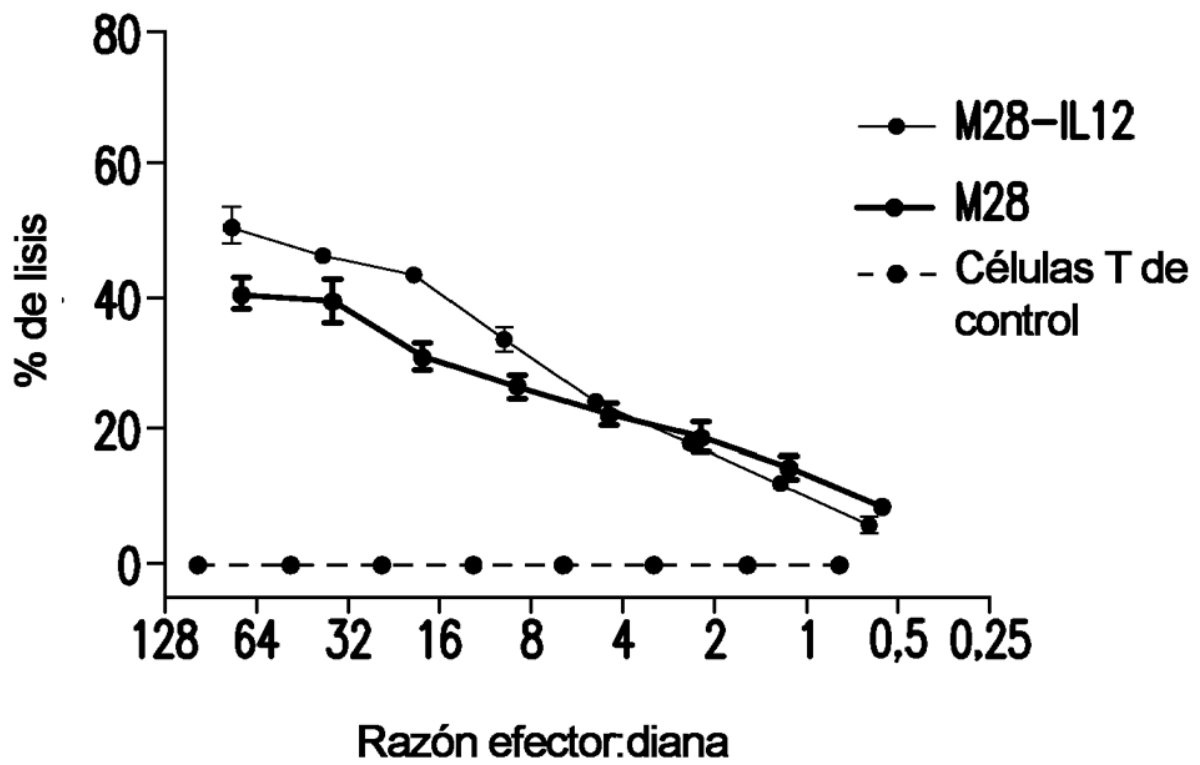


FIG. 22

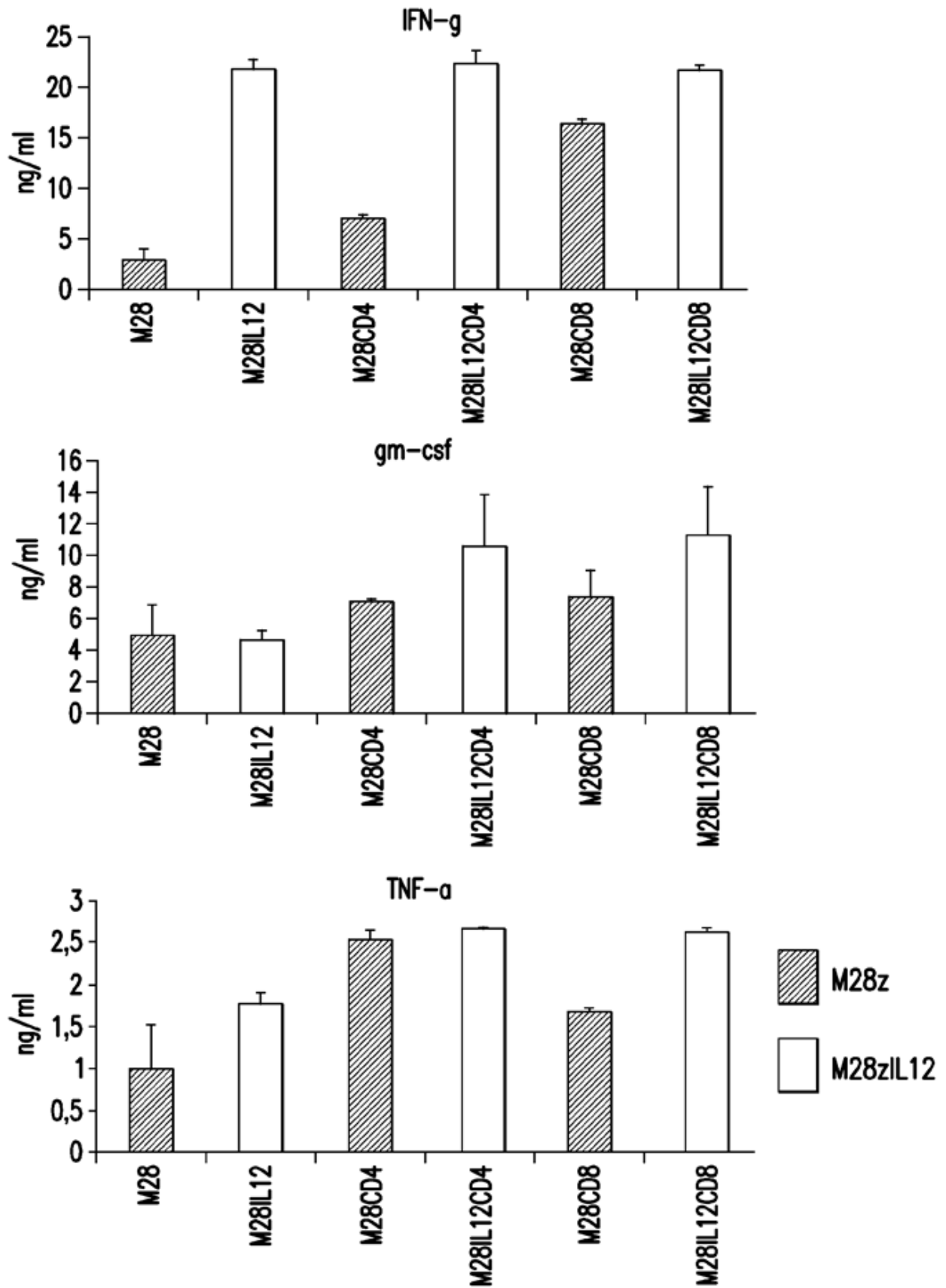
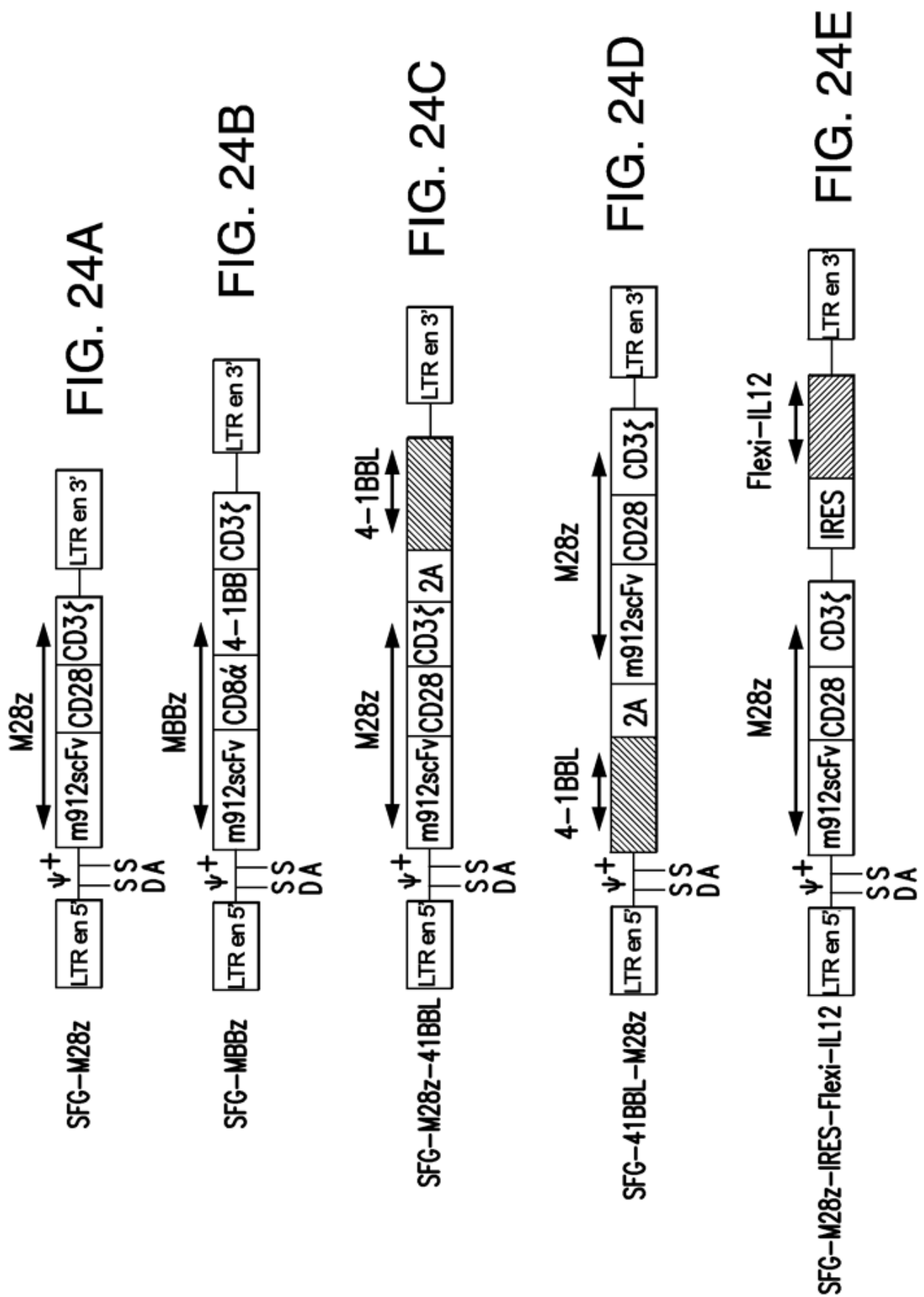


FIG. 23



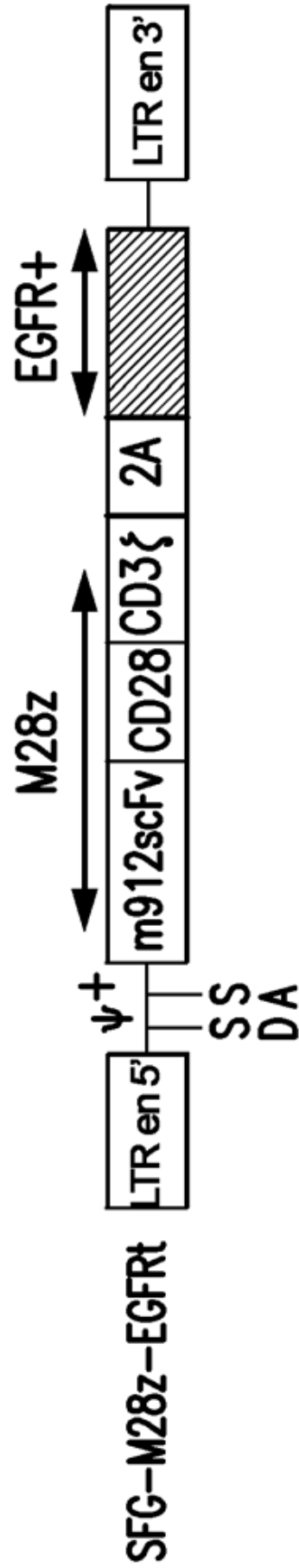


FIG. 25

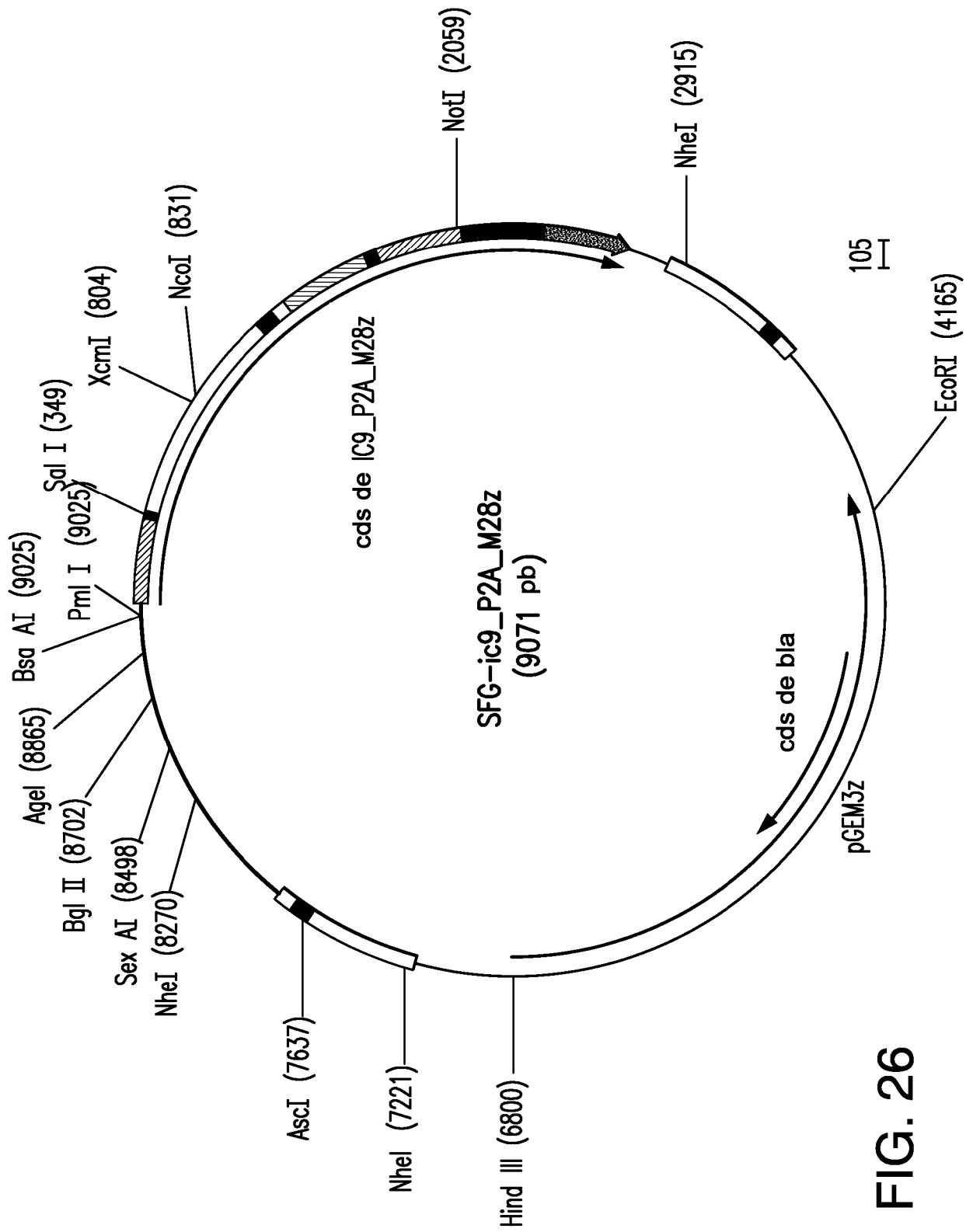


FIG. 26

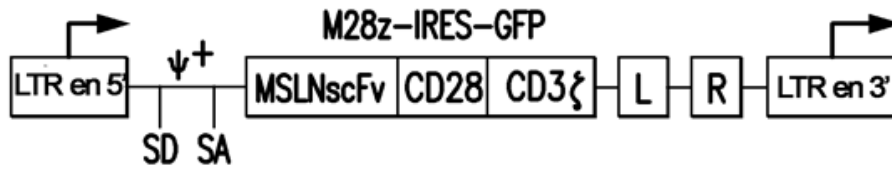


FIG. 27A

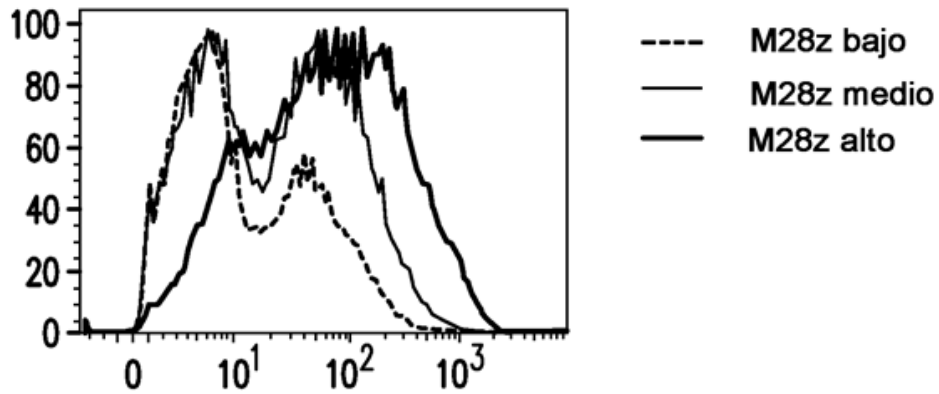


FIG. 27B

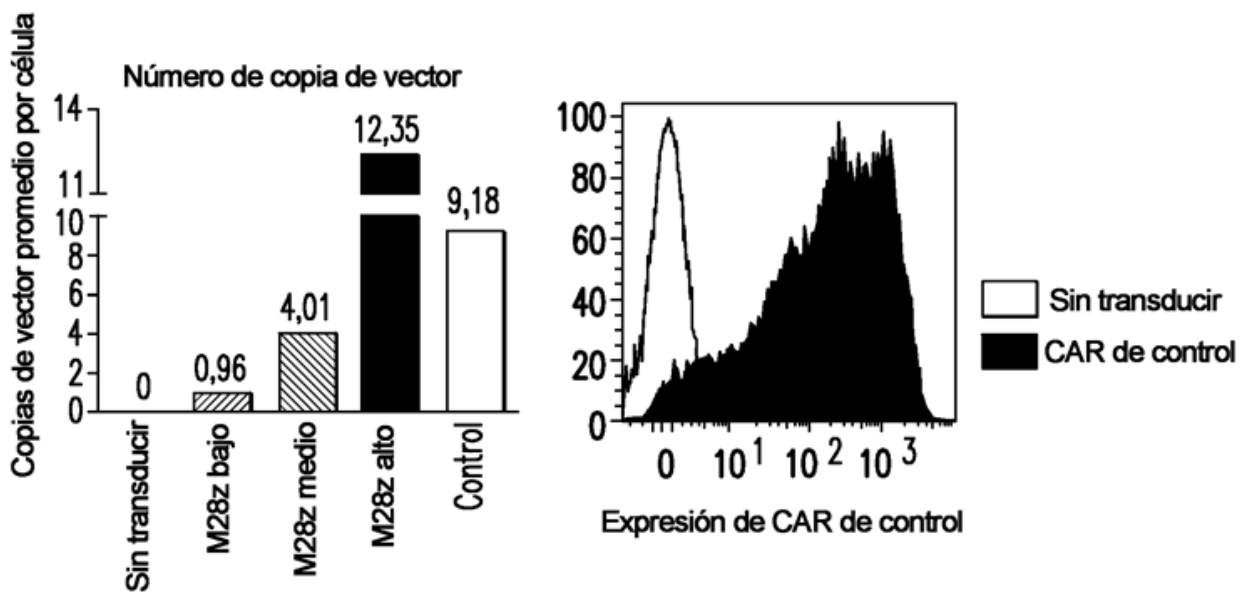


FIG. 27C

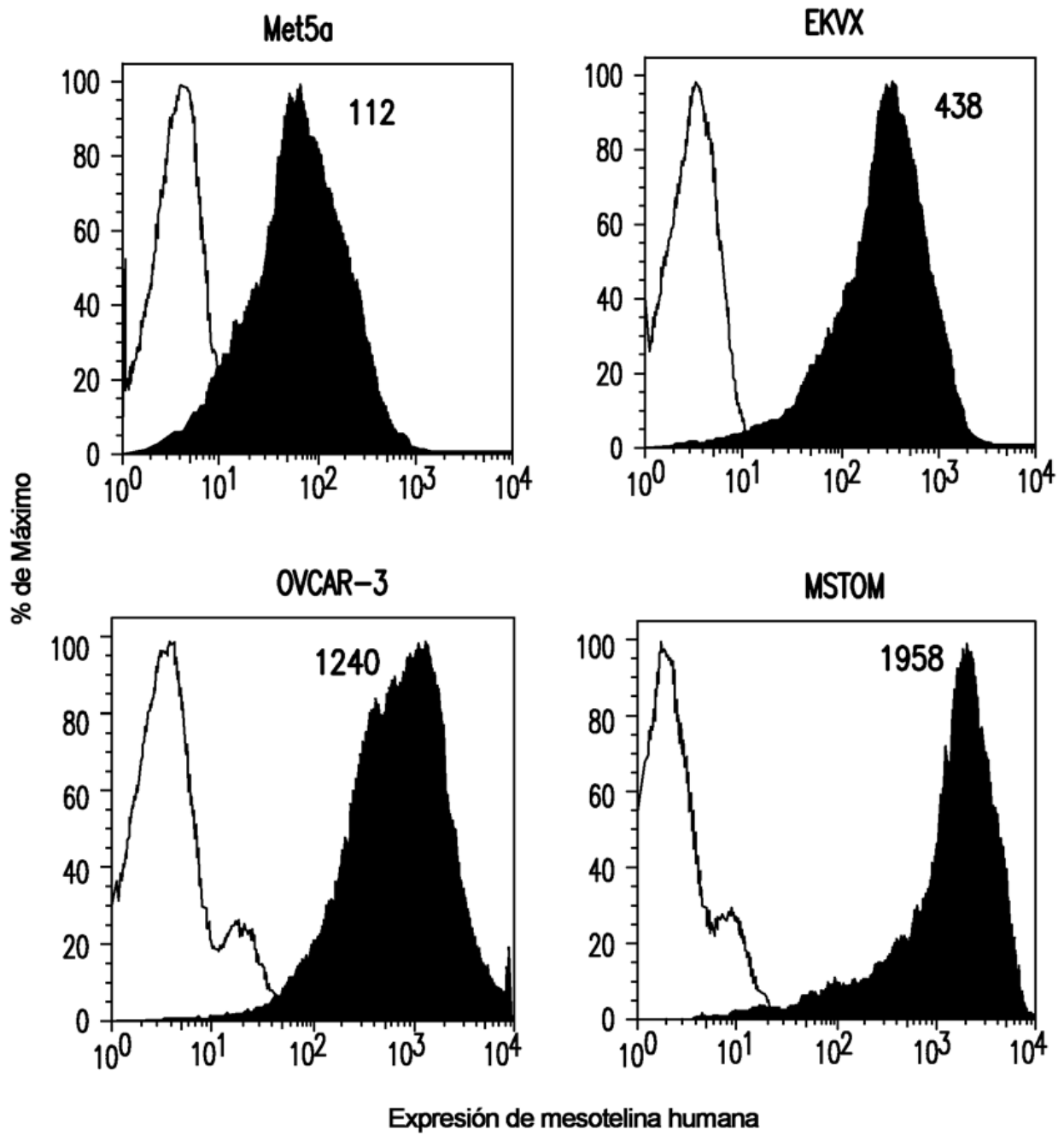


FIG. 28

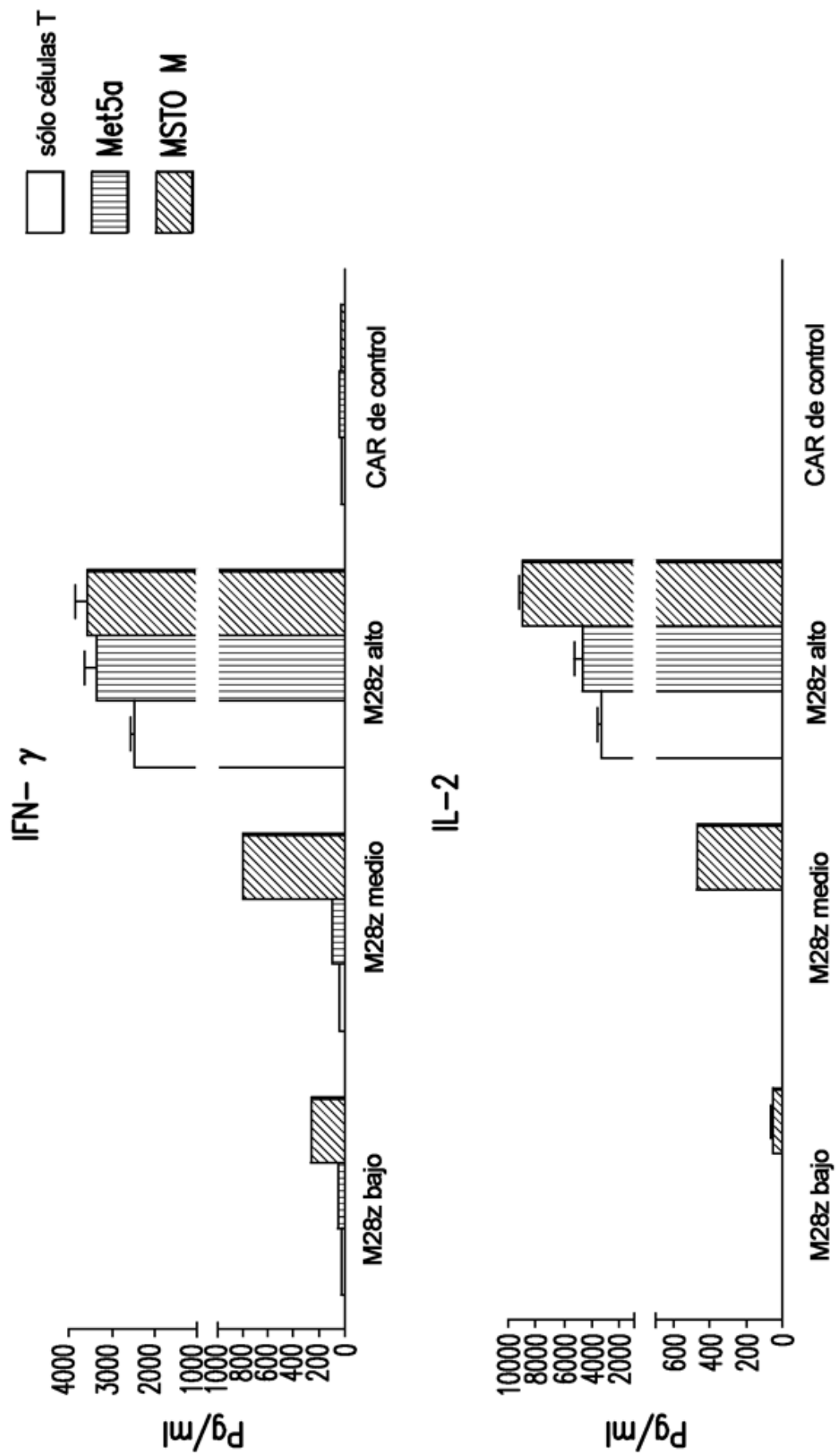


FIG. 29A

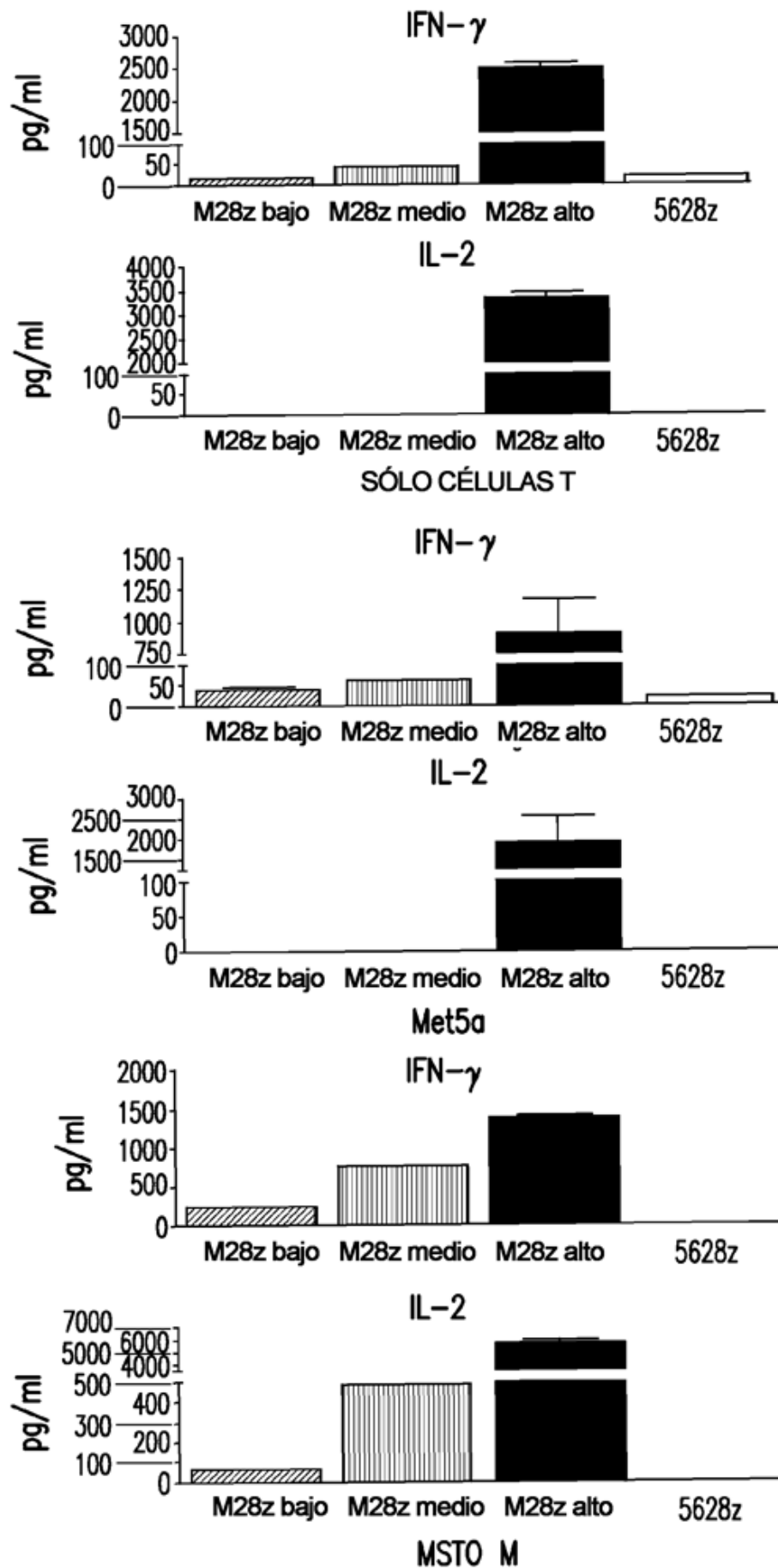


FIG. 29B

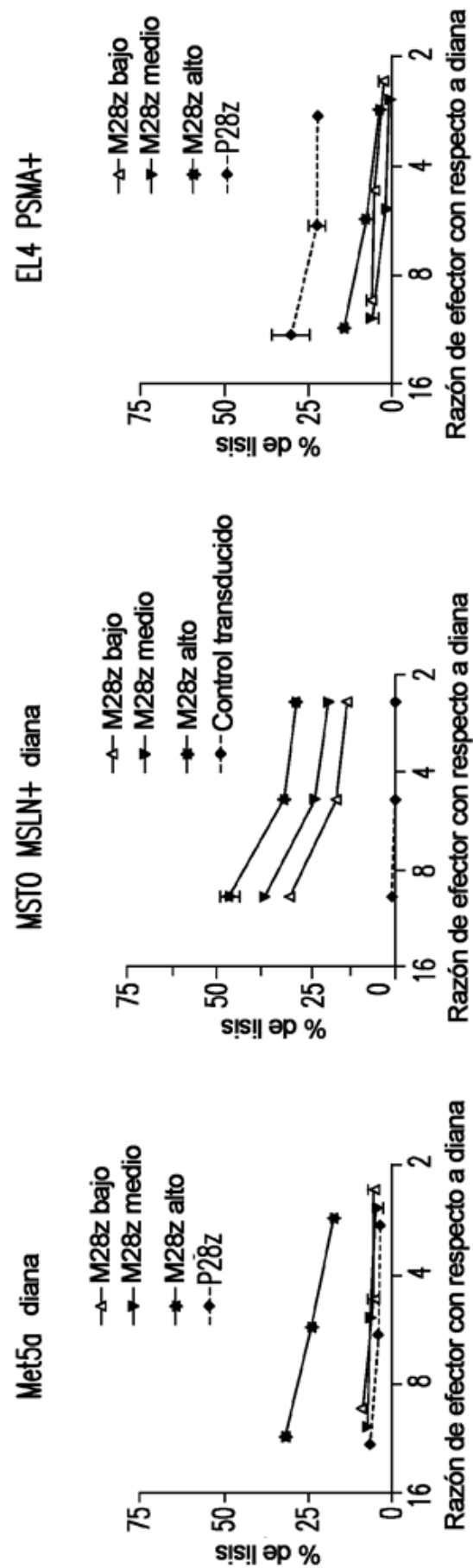


FIG. 30

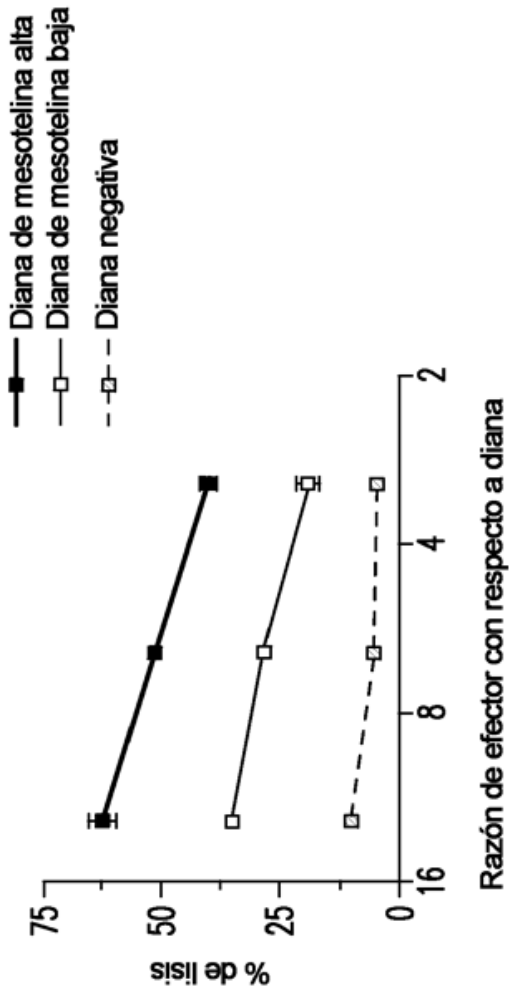


FIG. 31B

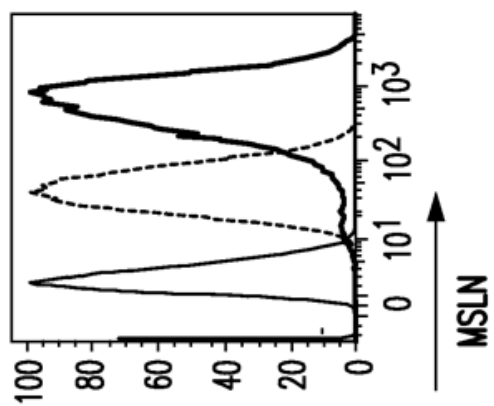


FIG. 31A

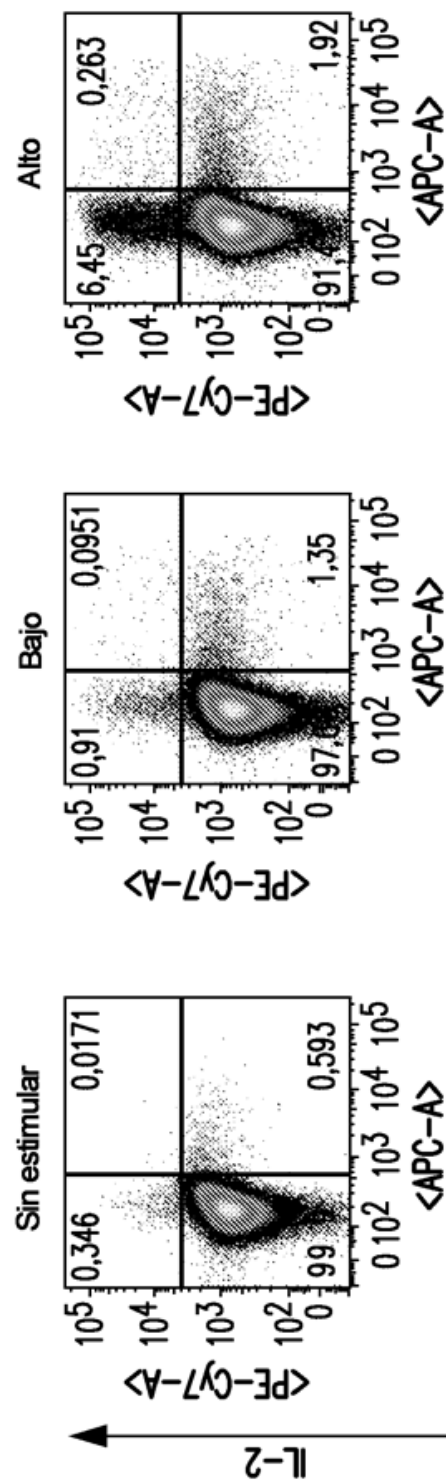


FIG. 31C

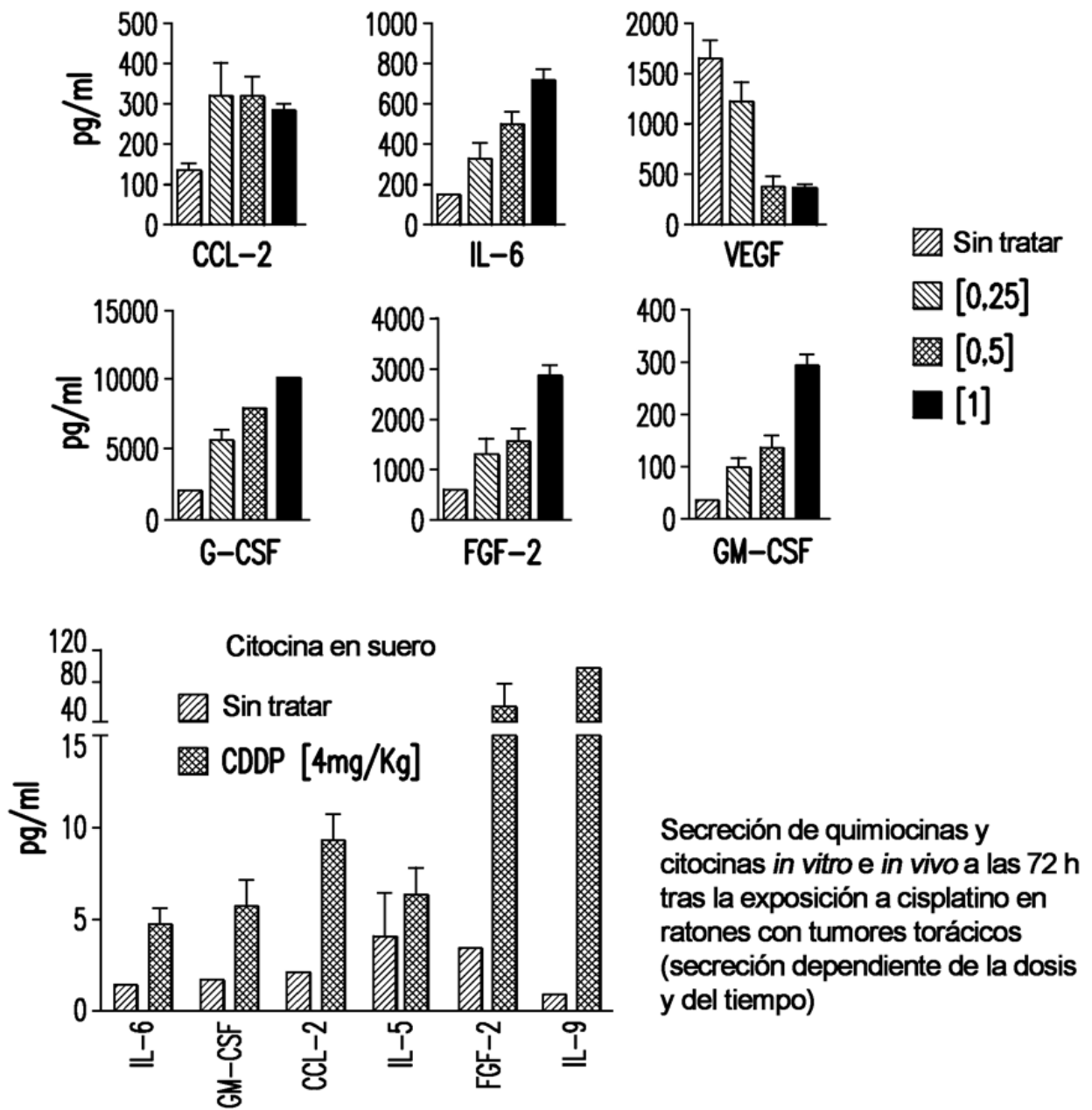
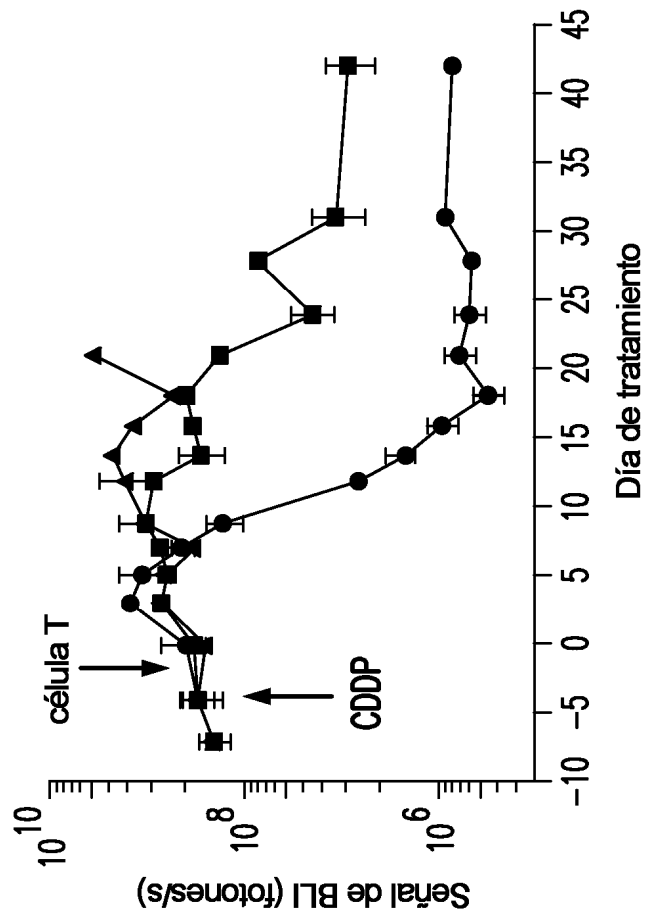
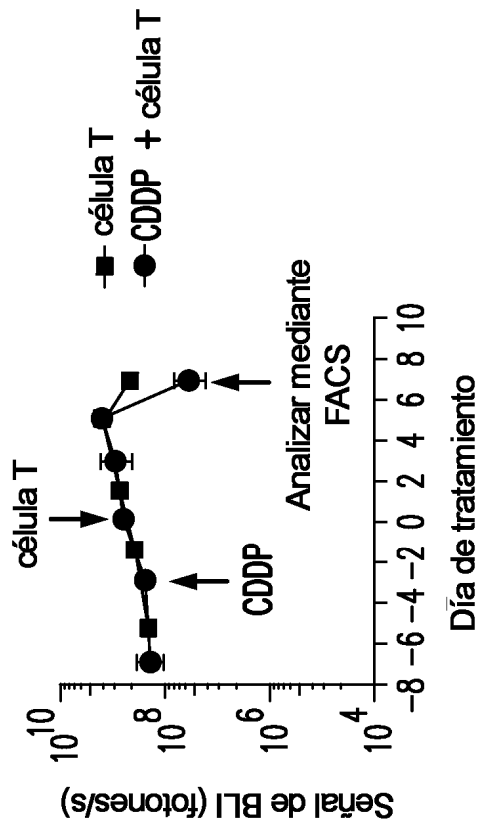
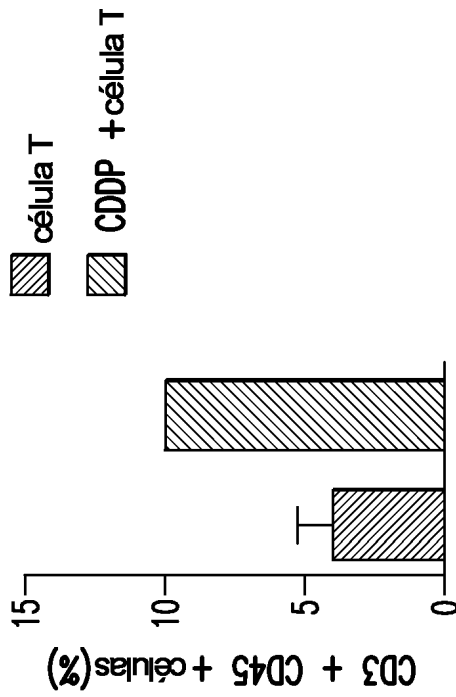
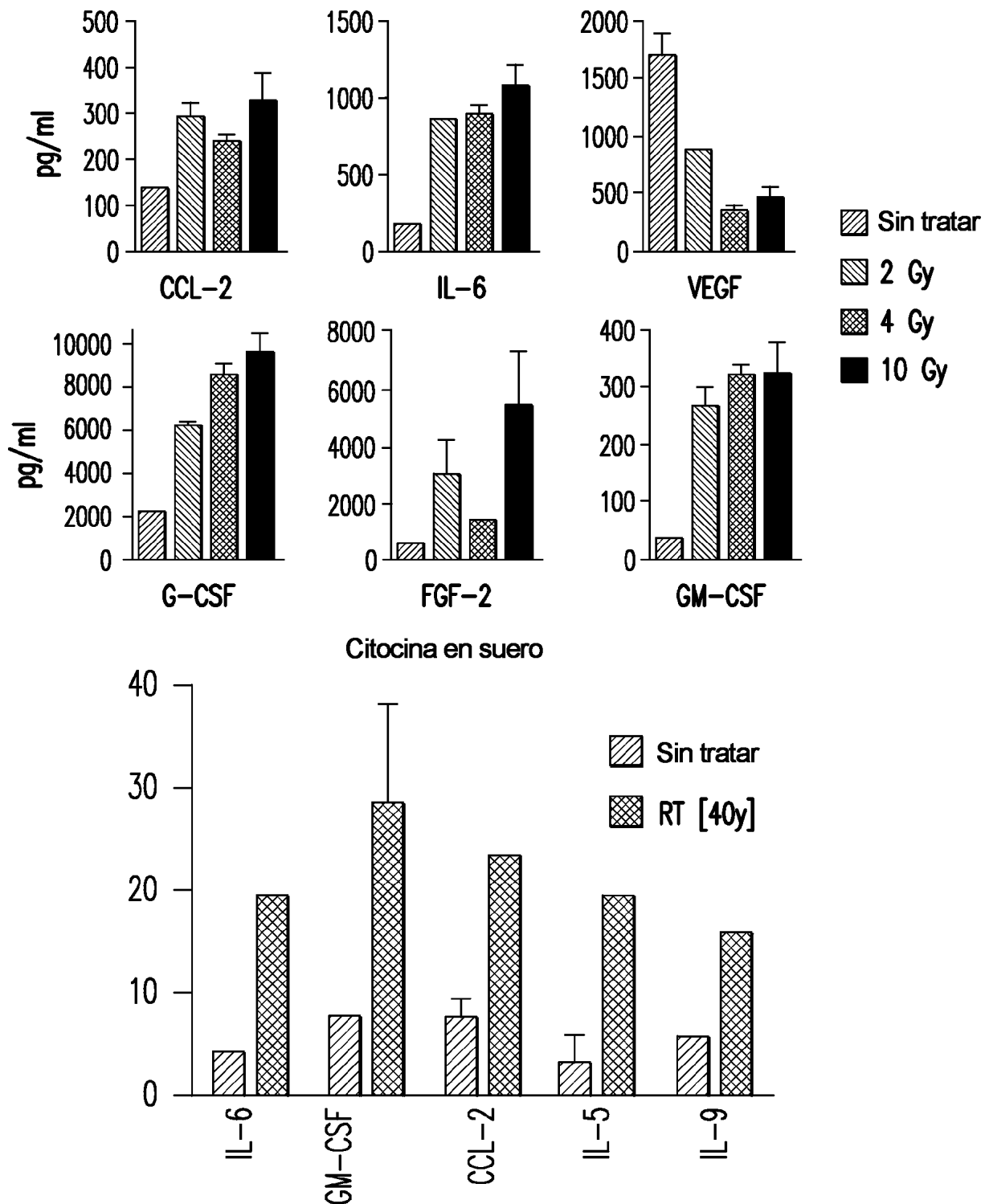


FIG. 32



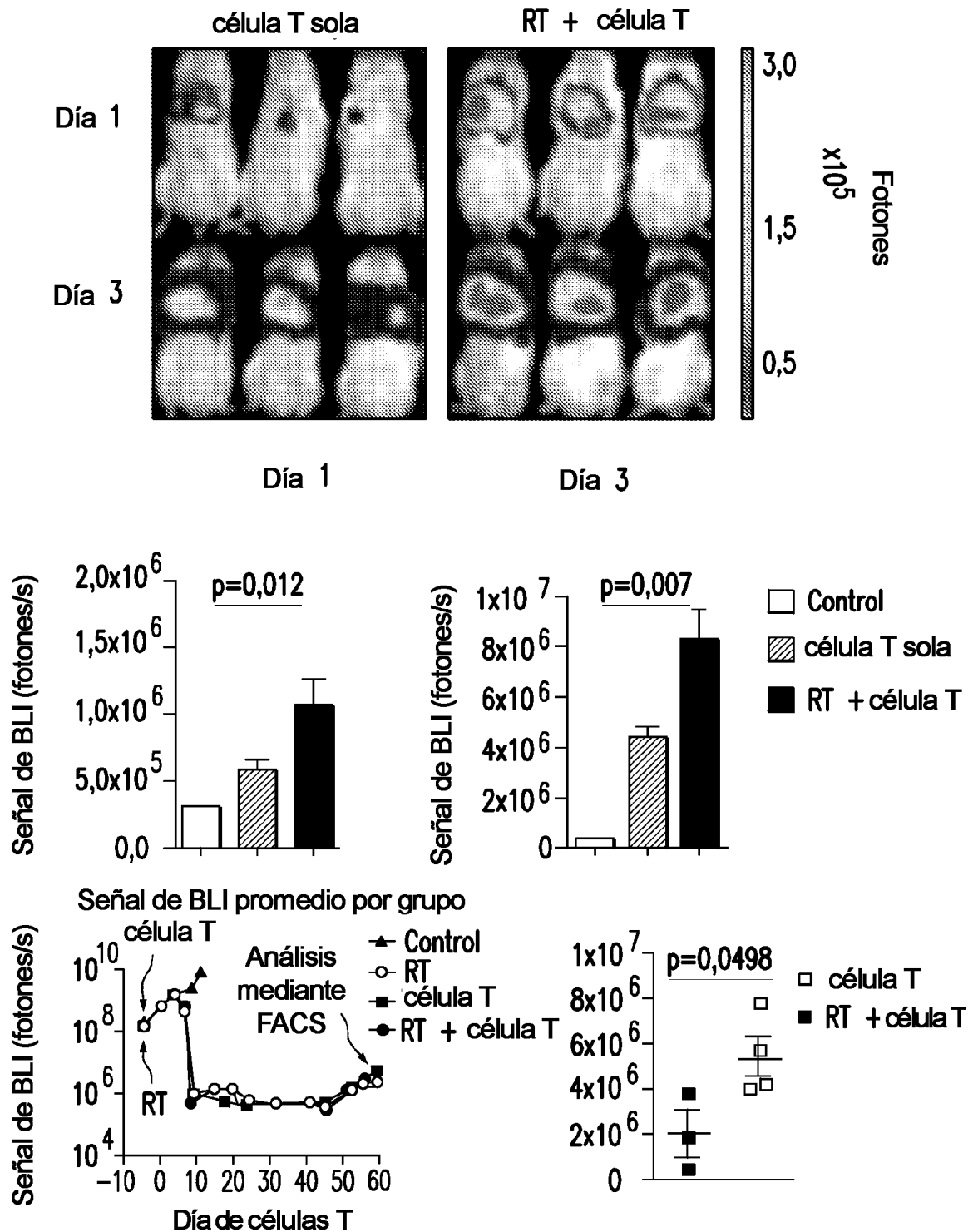
El tratamiento previo con cisplatino de ratones con tumores torácicos aumenta CAR + TILS tal como se determina mediante la BLI del tumor y la citometría de flujo del tumor recogido el día 7 de células T; potencia la reducción de la carga tumoral

FIG. 32 continuación



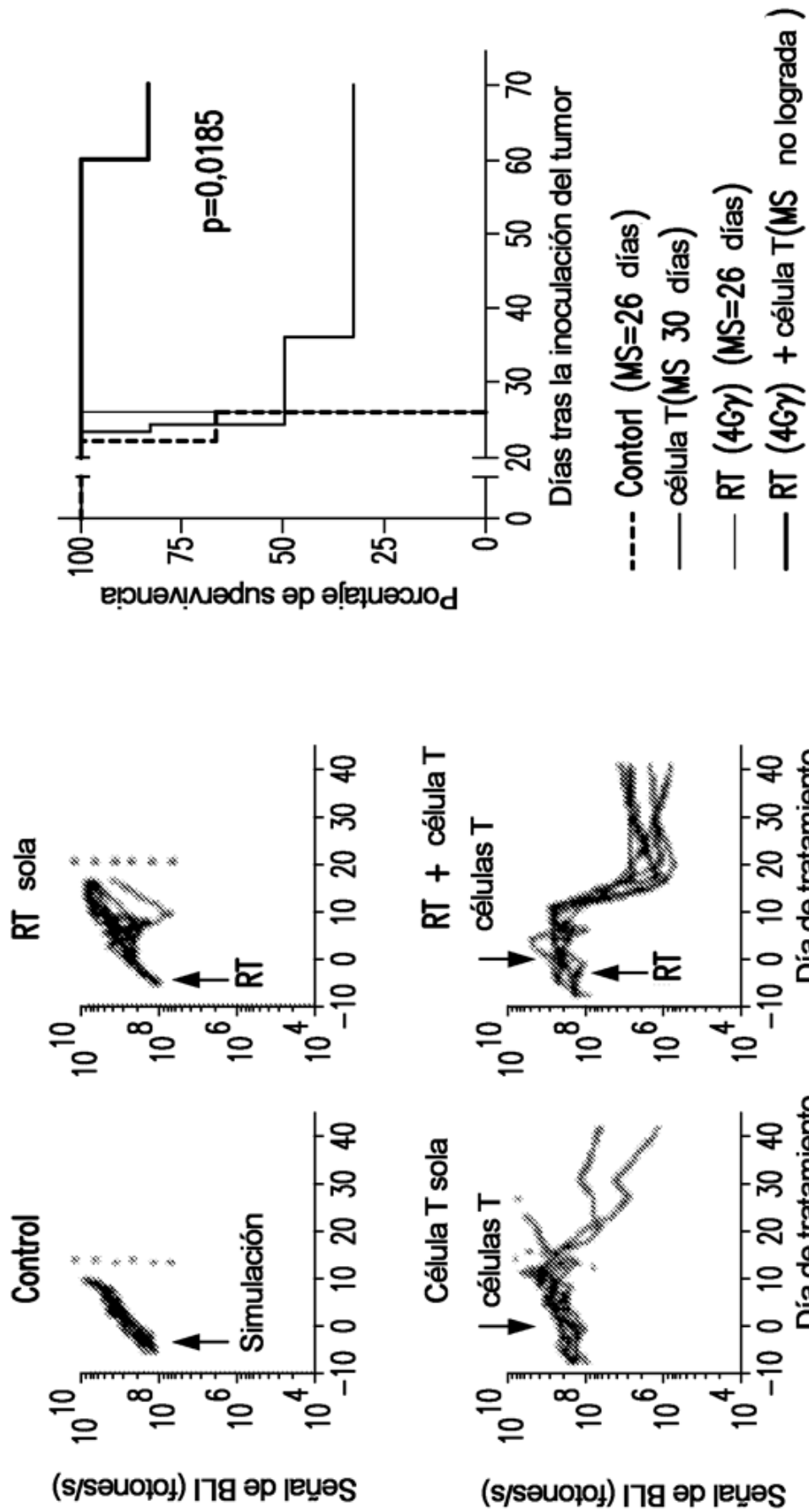
Secreción de quimiocinas y citocinas *in vitro* (A) e *in vivo* (B) a las 72 h tras la exposición a radiación hemitorácica exposición a radioterapia hemitorácica (HTRT) en ratones con tumores torácicos

FIG. 33



La radioterapia hemitorácica antes de la administración de células T-CAR+ aumentó la acumulación de células T tal como se monitoriza mediante BLI de células T (A y B), análisis de bazo recogidos (día 56, células T) mostró una mayor proporción de células T persistentes (C) en comparación con ratones que recibieron células T solas.

FIG. 34



En ratones tratados previamente con HTRT antes de la administración intravenosa a baja dosis de células T-CAR+, la BLI del tumor demuestra regresión del tumor potenciada (A) y supervivencia prolongada (B)

FIG. 34A

FIG. 34B

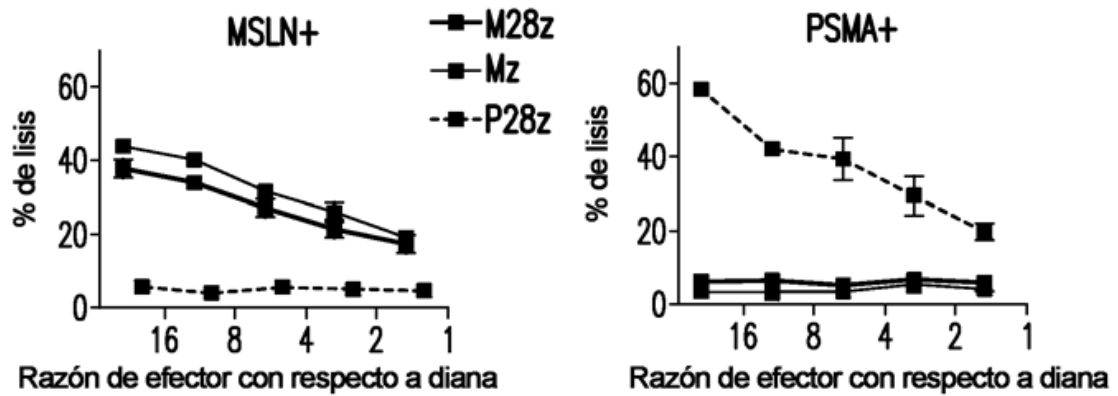


FIG. 35A

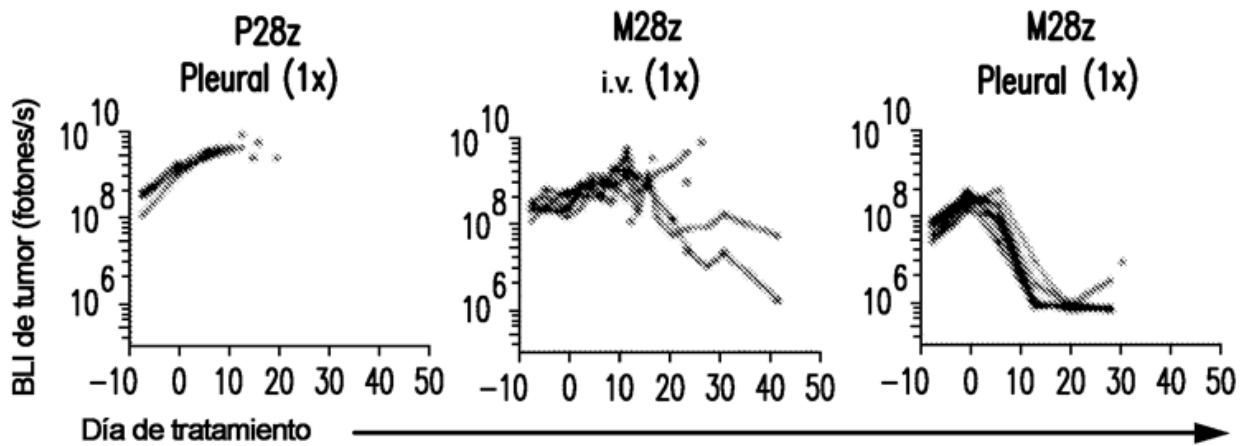


FIG. 35B

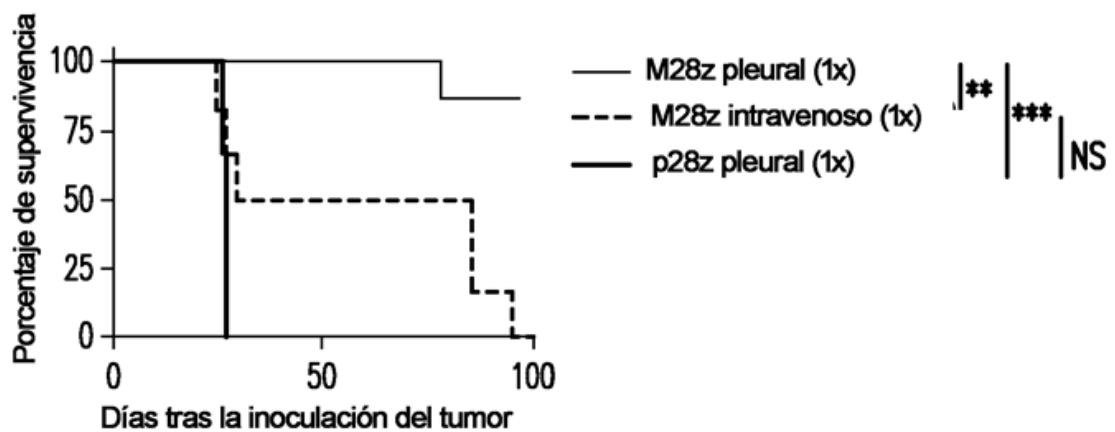


FIG. 35C

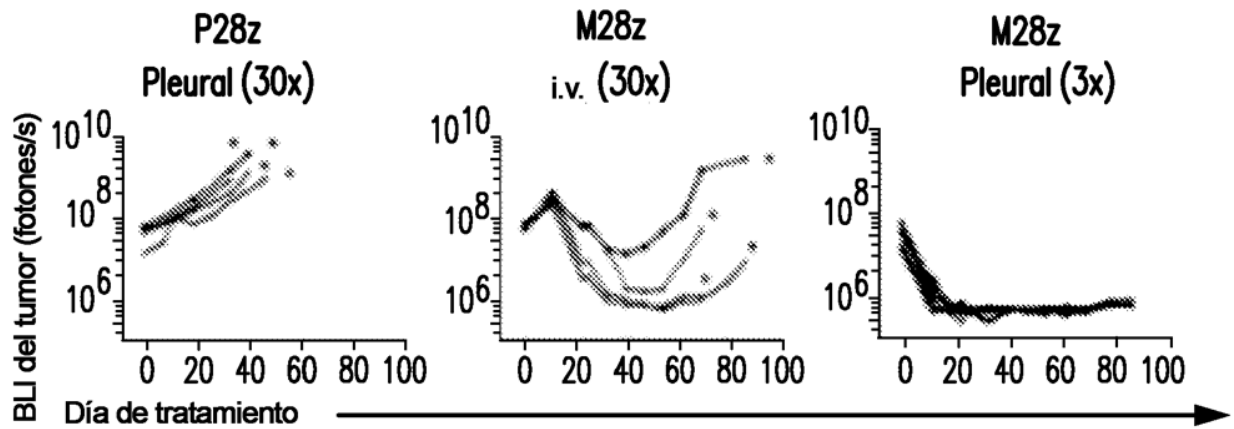


FIG. 35D

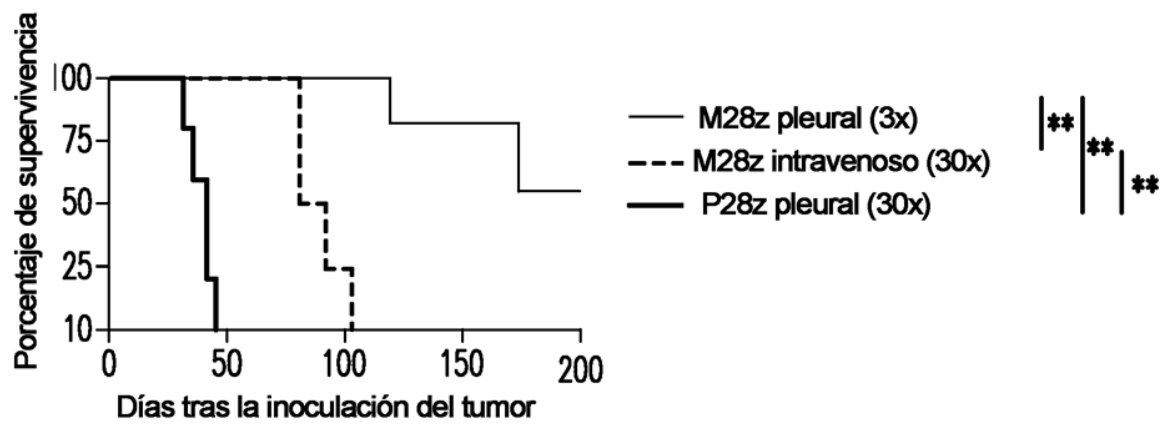


FIG. 35E

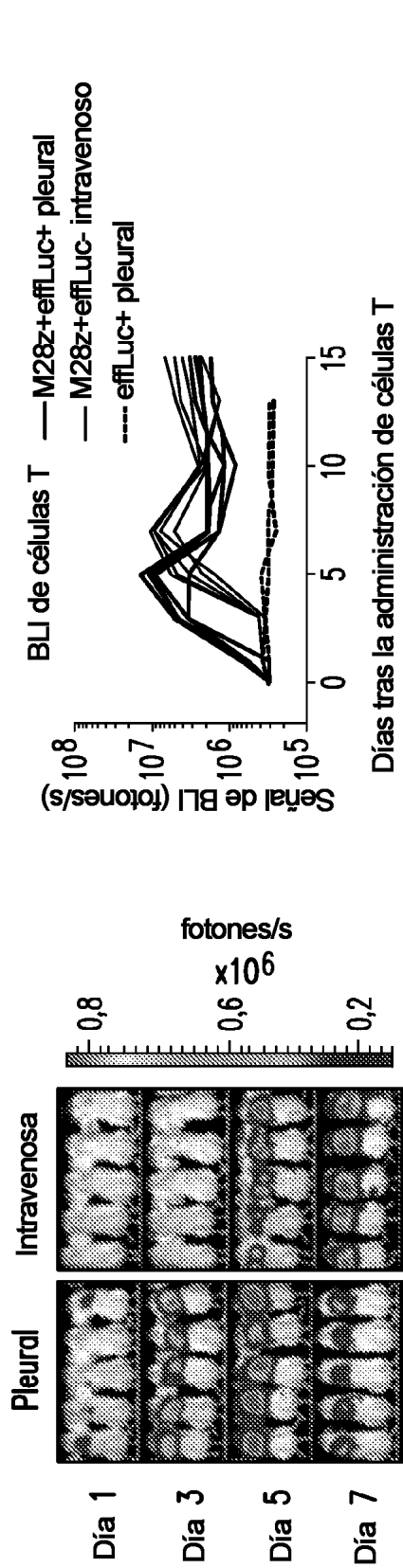
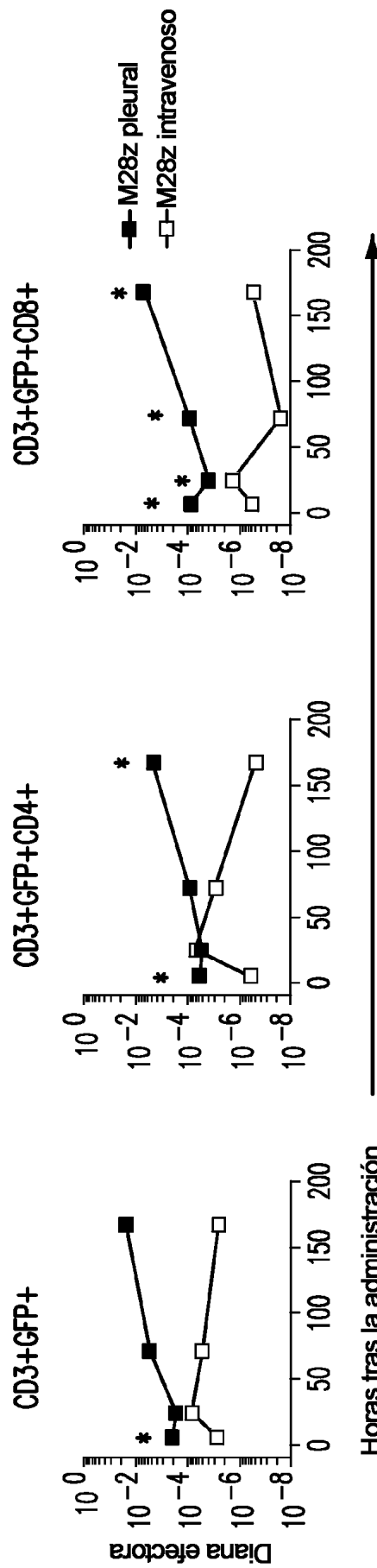
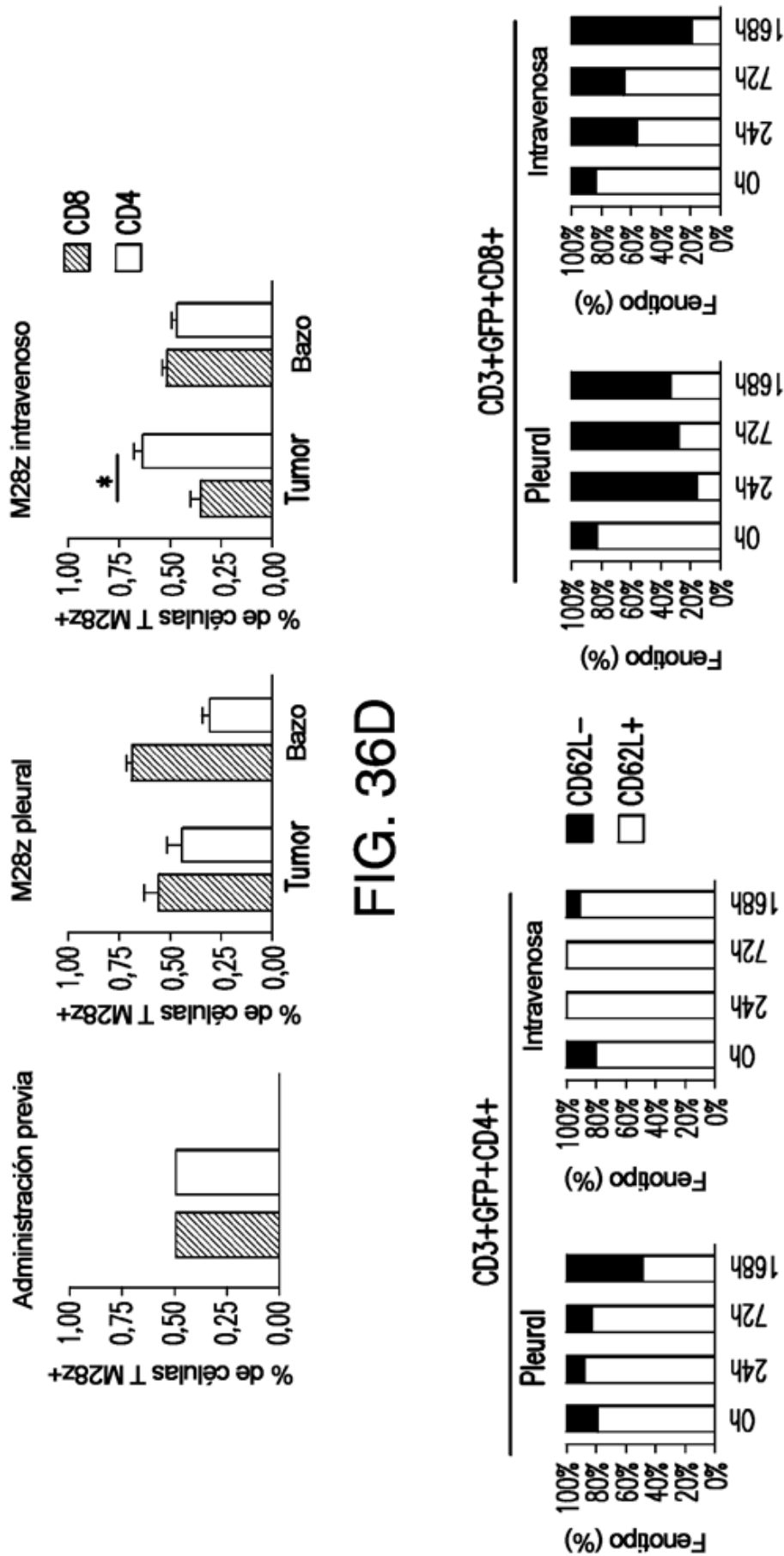


FIG. 36B





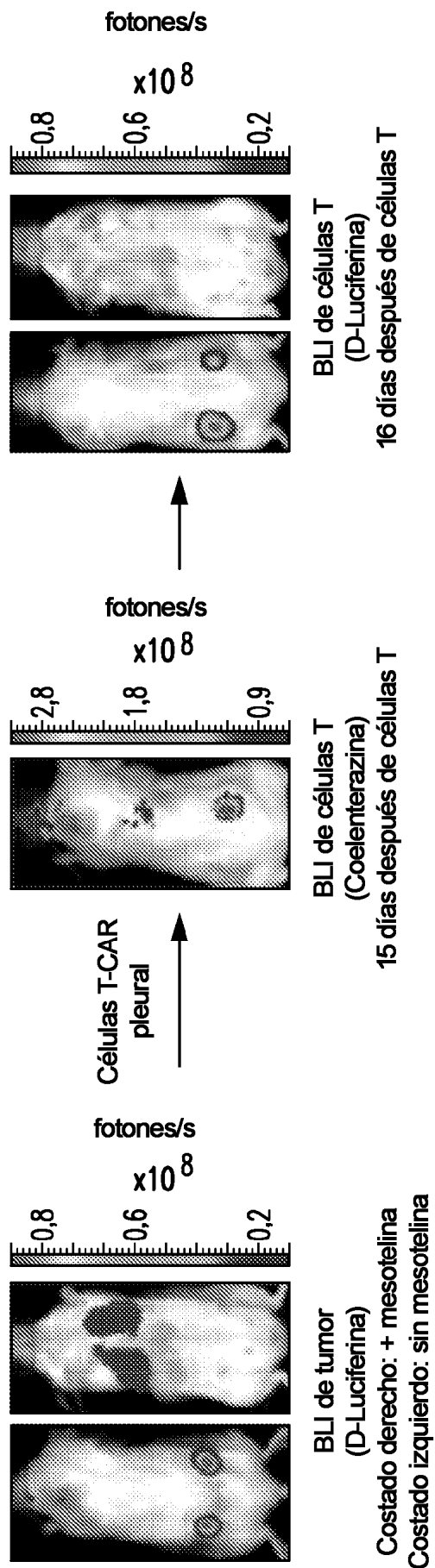


FIG. 37A

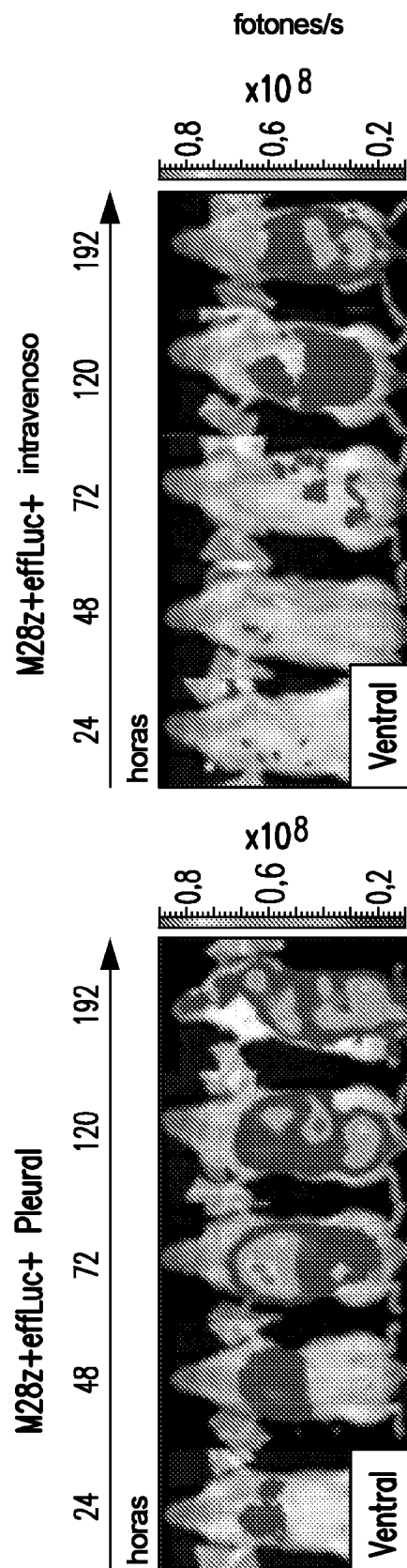


FIG. 37B

Señal de células T peritoneal

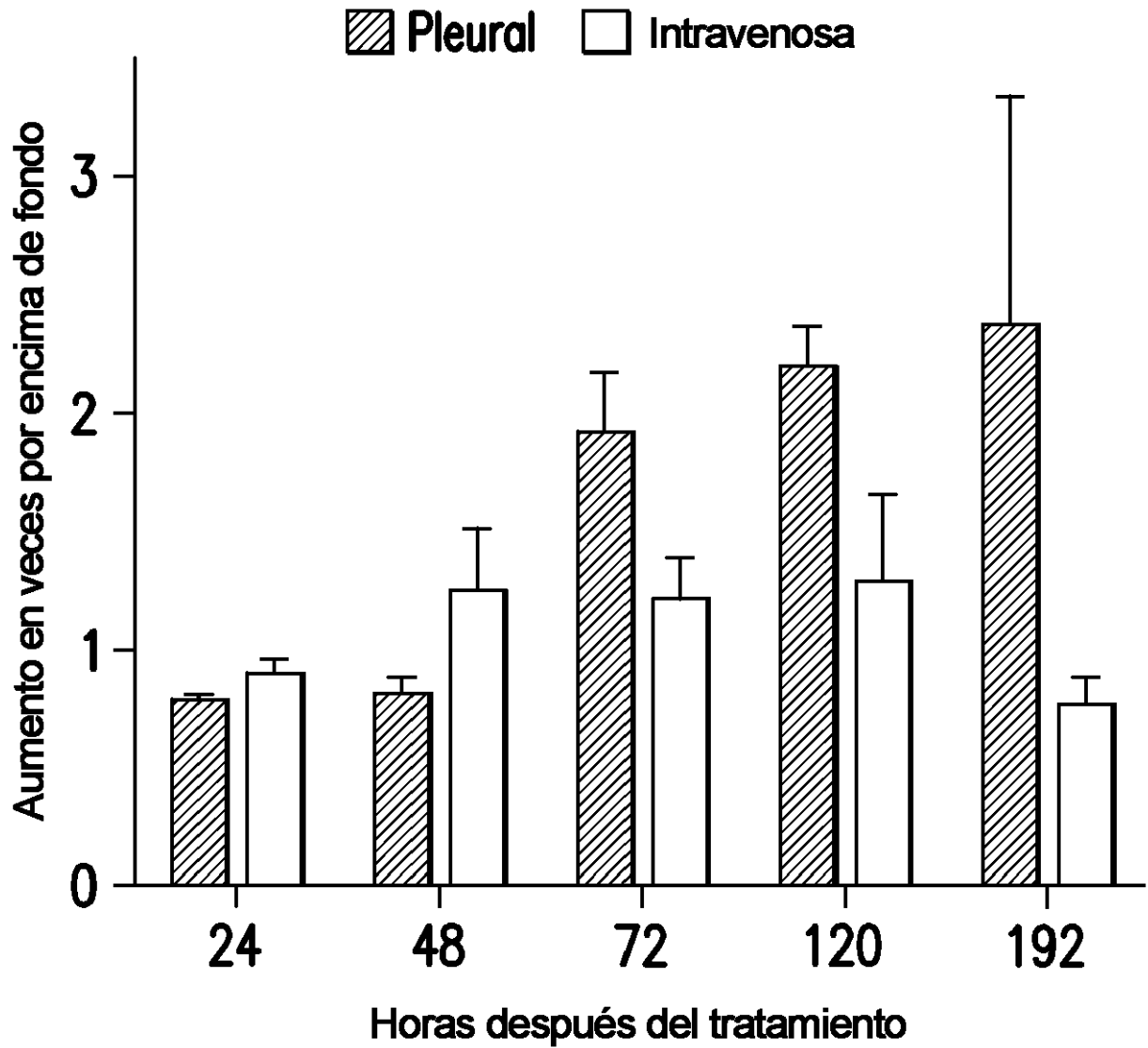


FIG. 37C

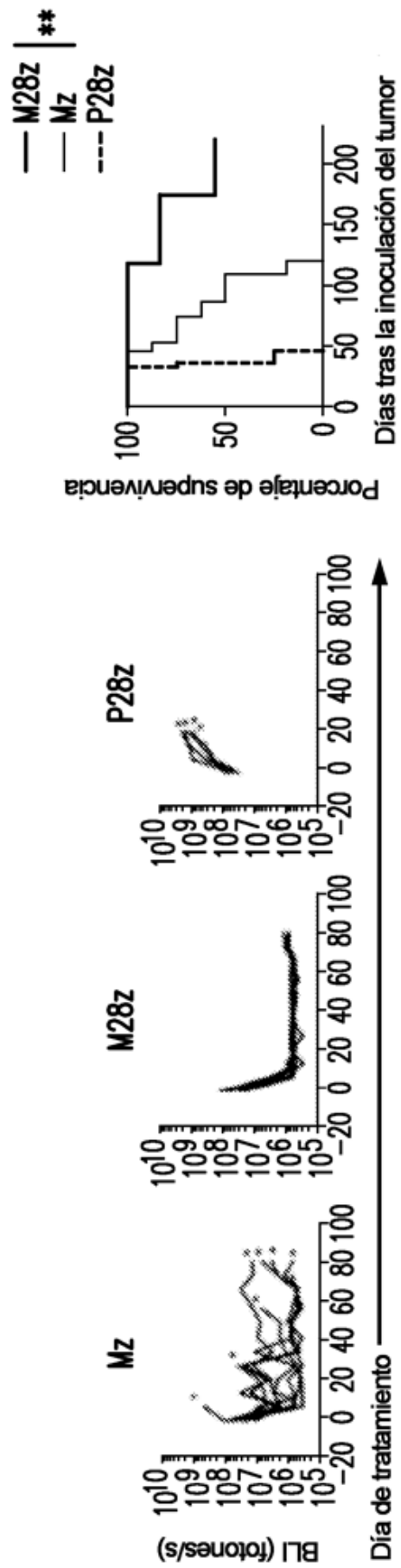


FIG. 38A

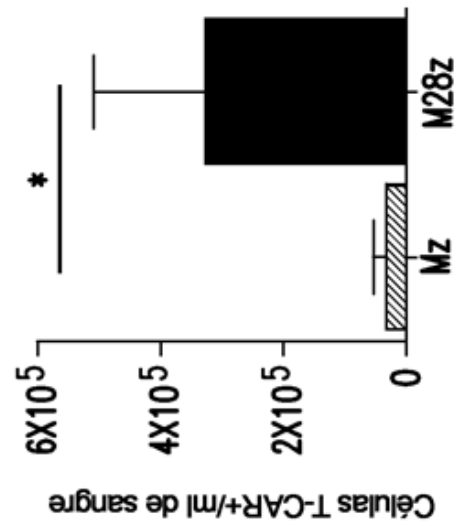


FIG. 38B

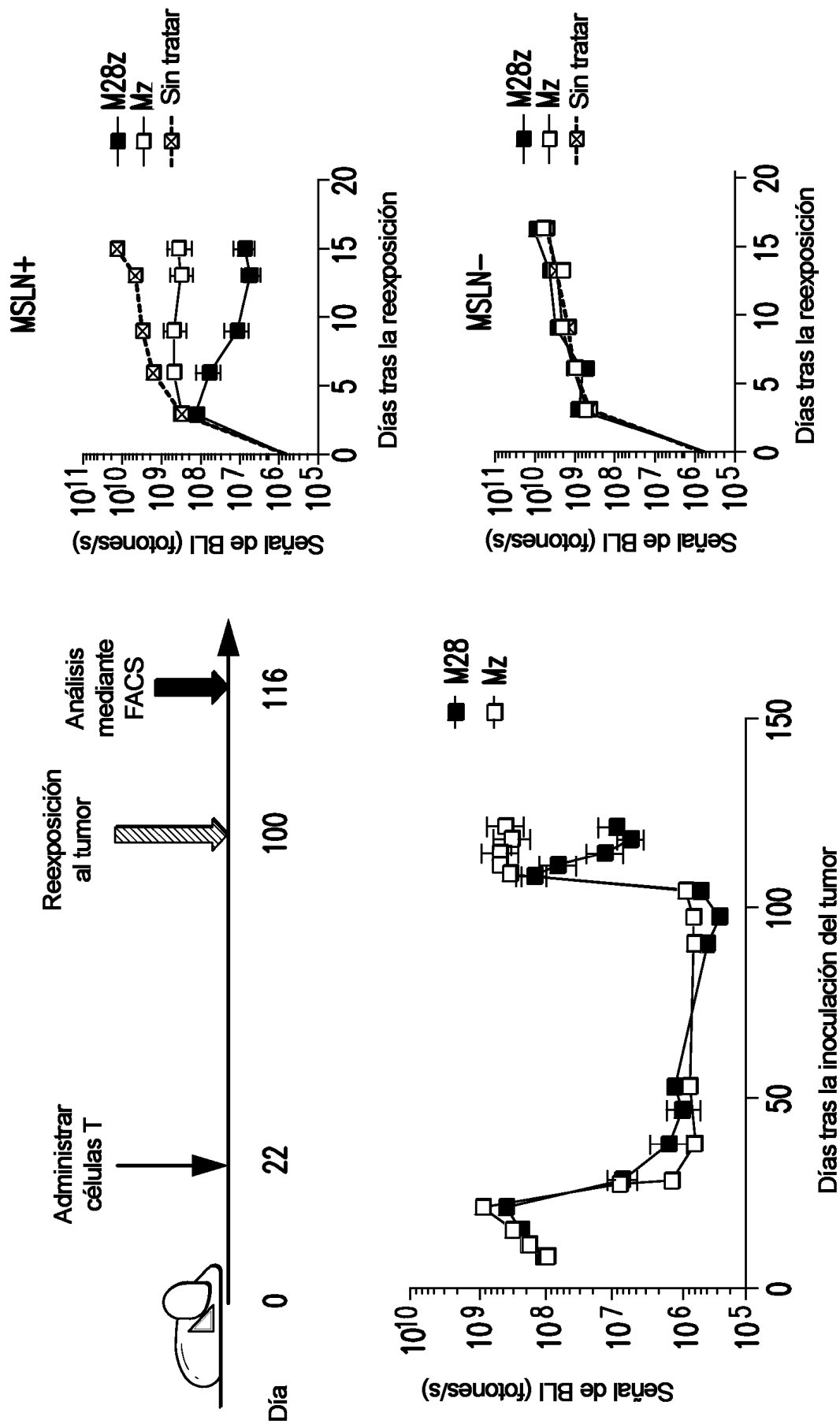


FIG. 39

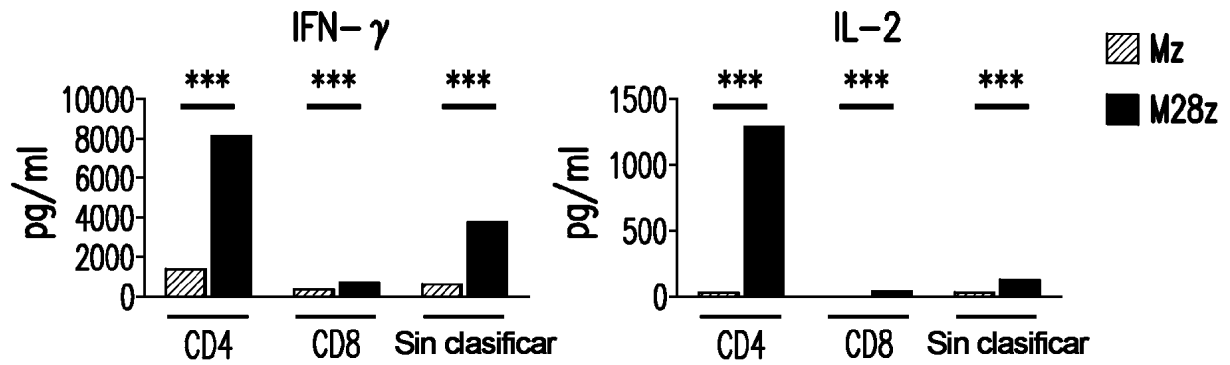


FIG. 40A

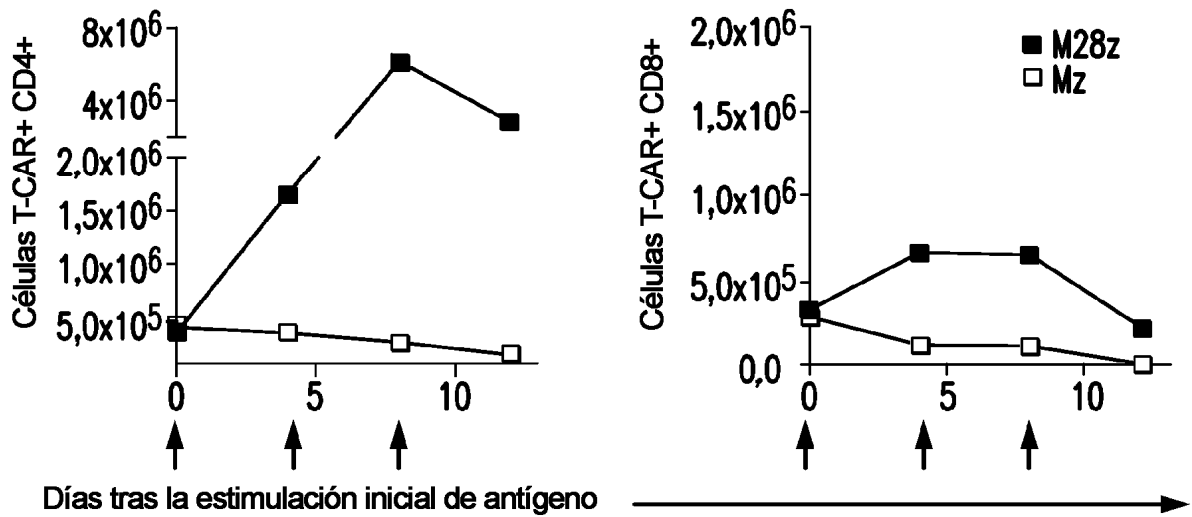


FIG. 40B

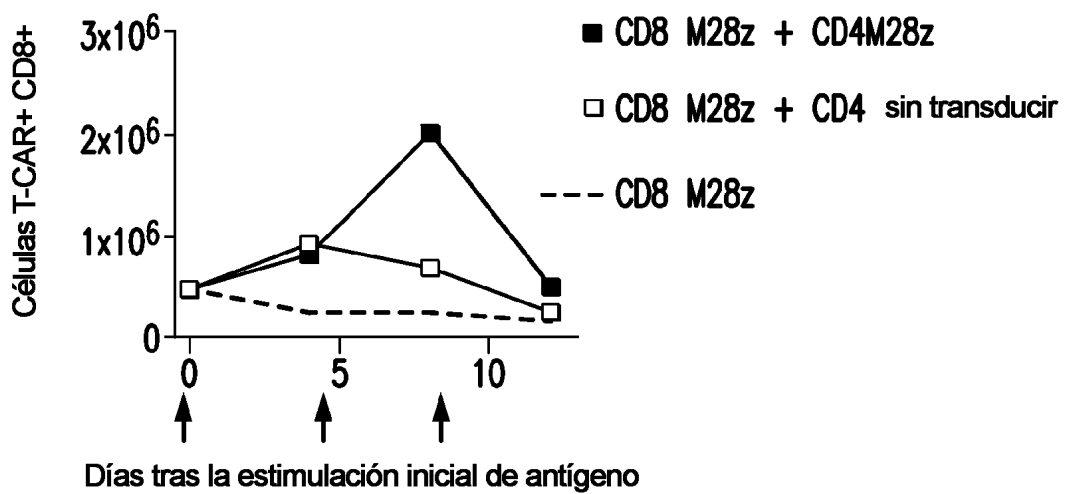


FIG. 40C

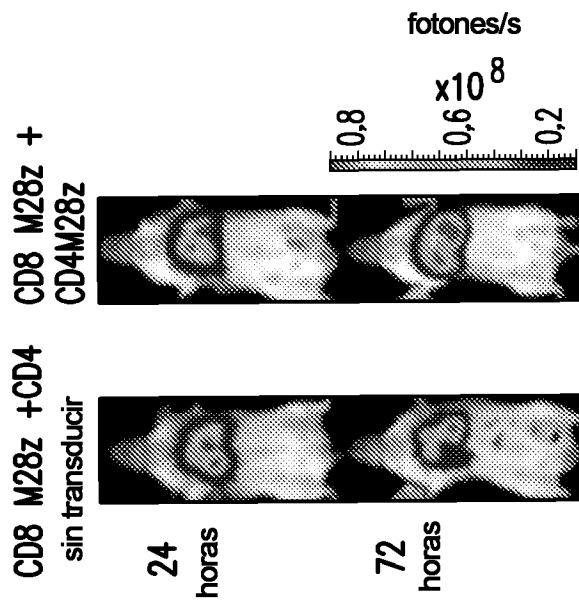


FIG. 40D

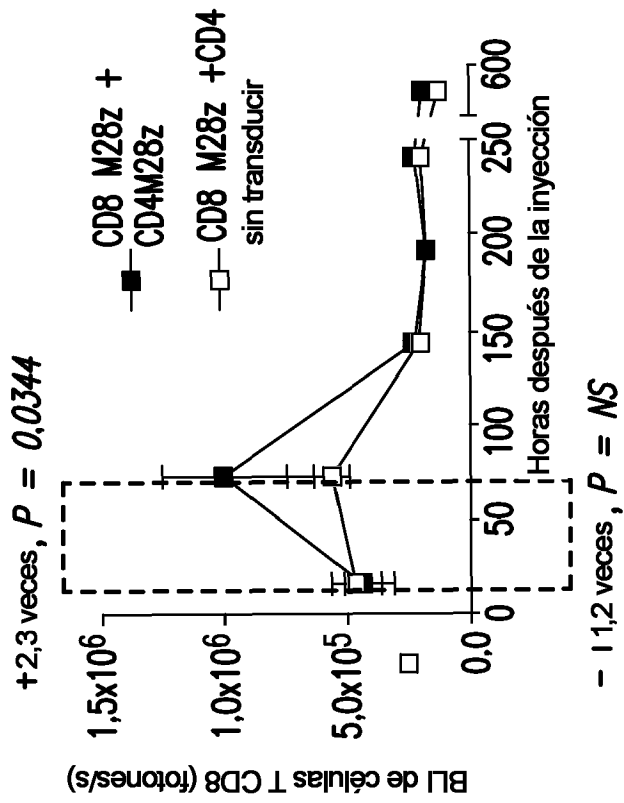


FIG. 40E

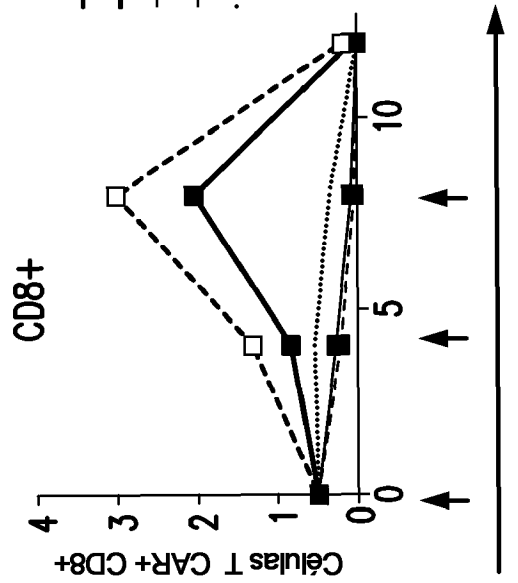
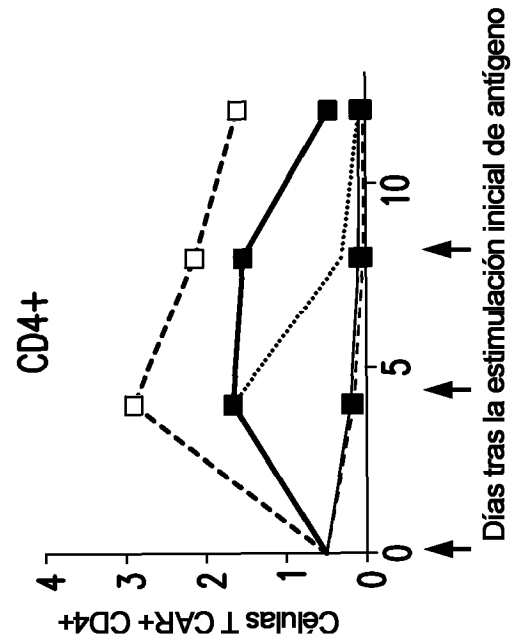


FIG. 40F

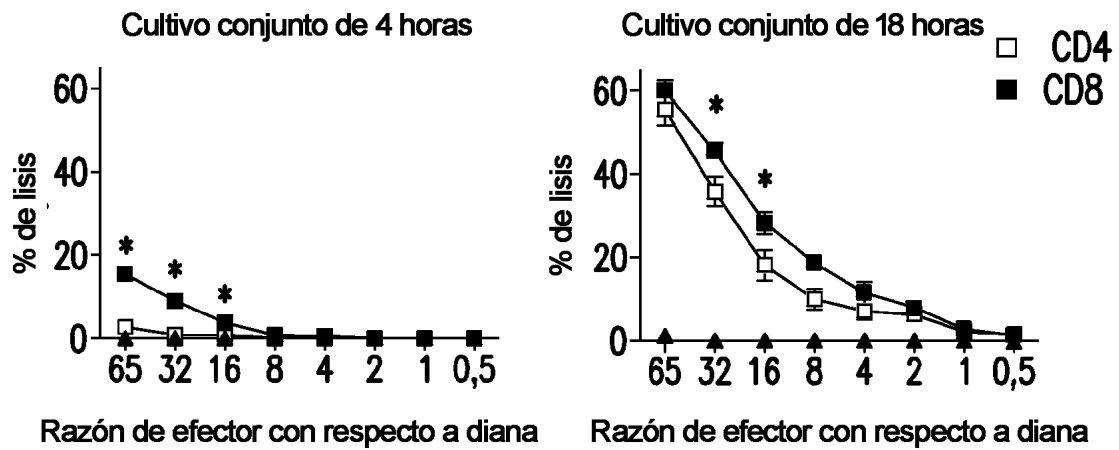


FIG. 41A

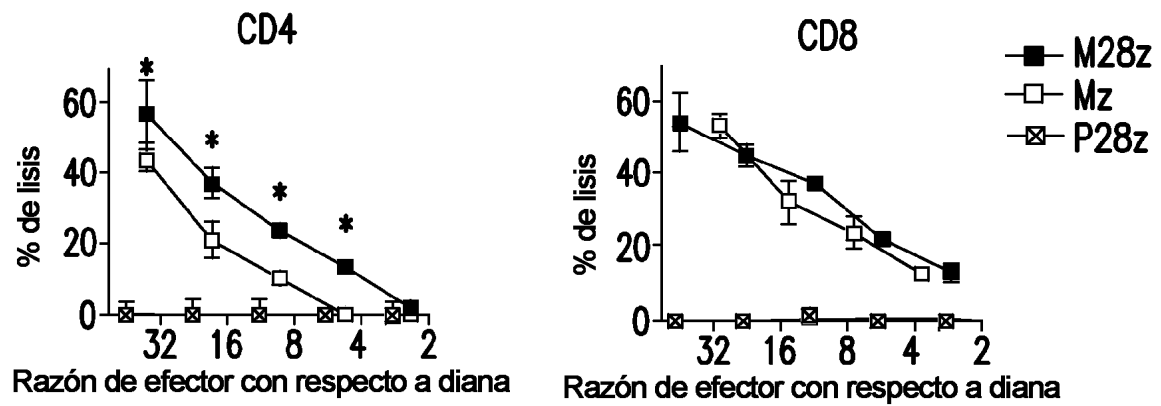


FIG. 41B

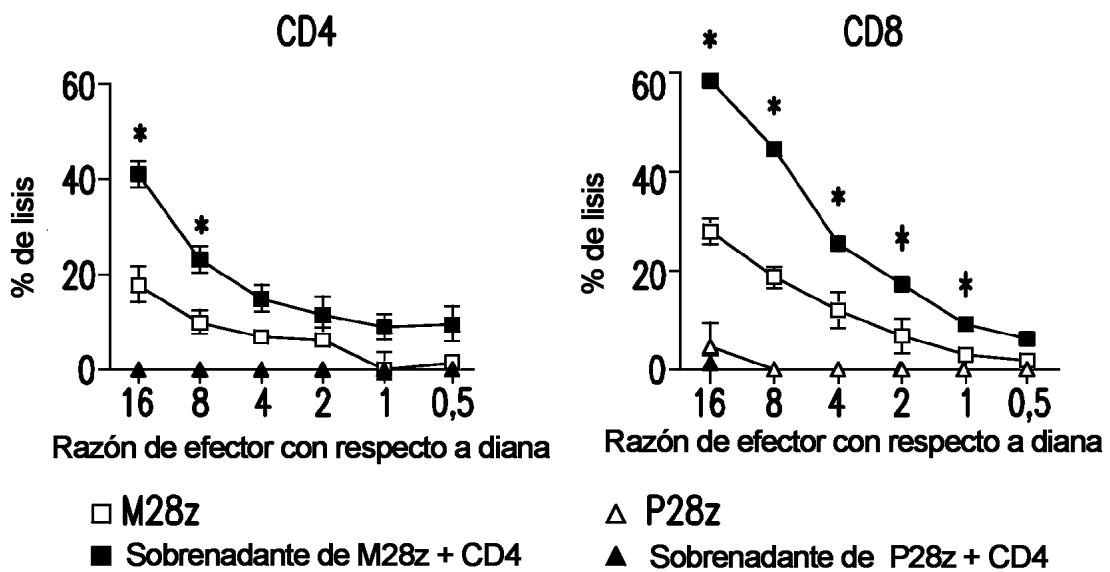


FIG. 41C

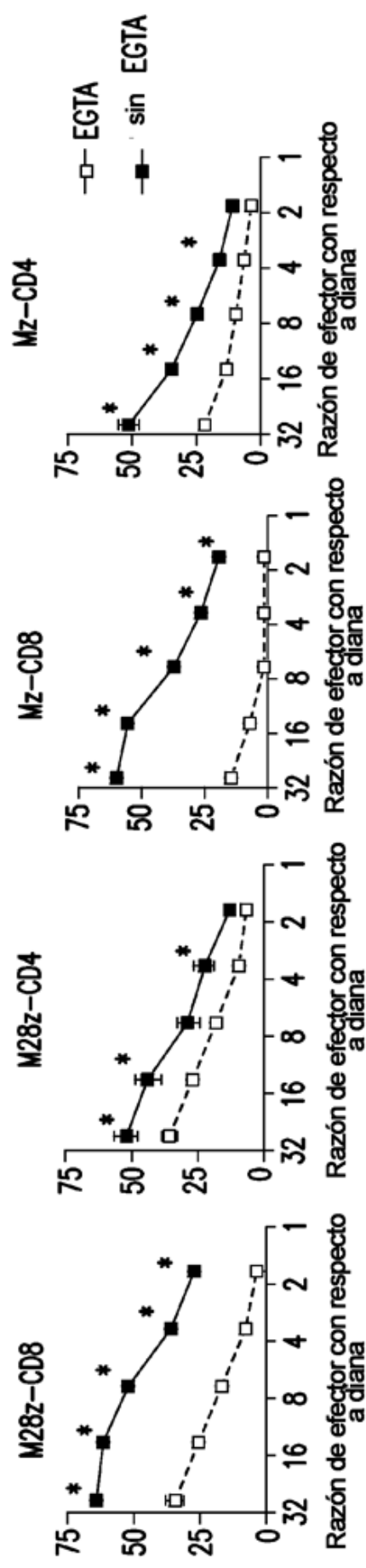


FIG. 41D

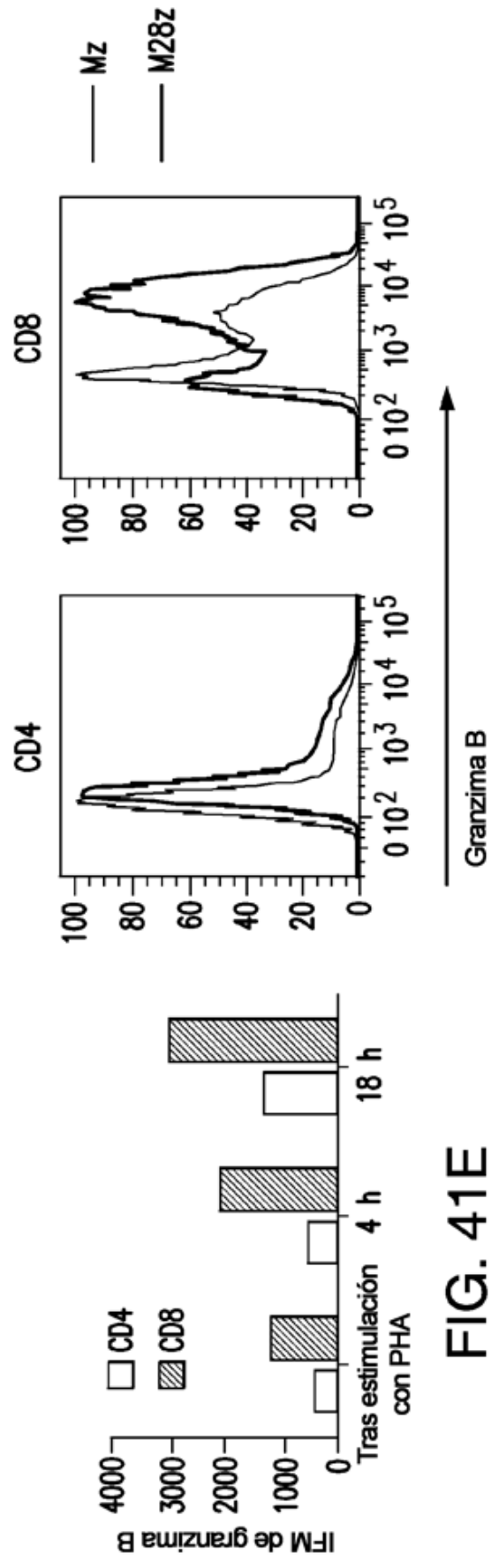


FIG. 41F

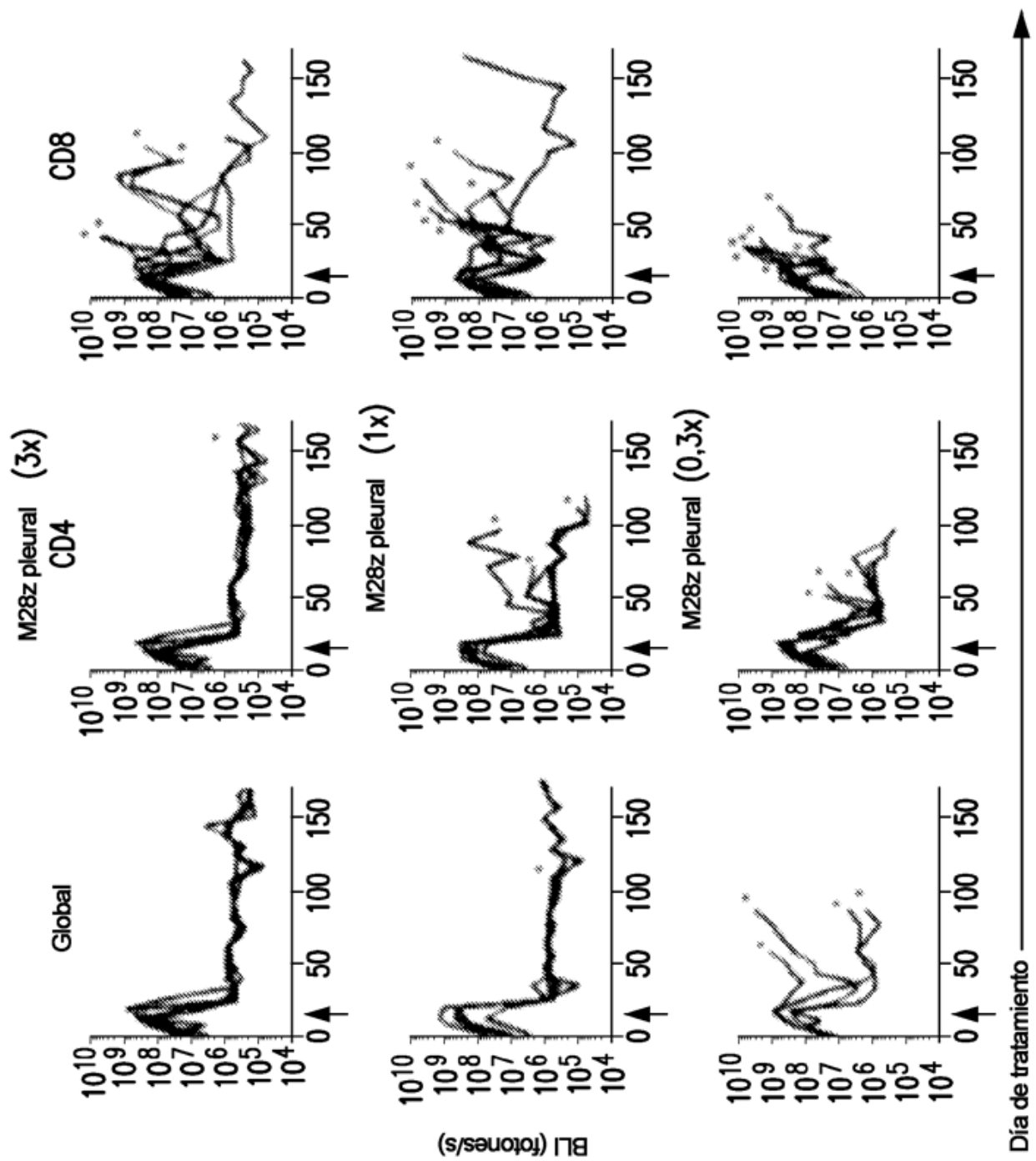


FIG. 42A

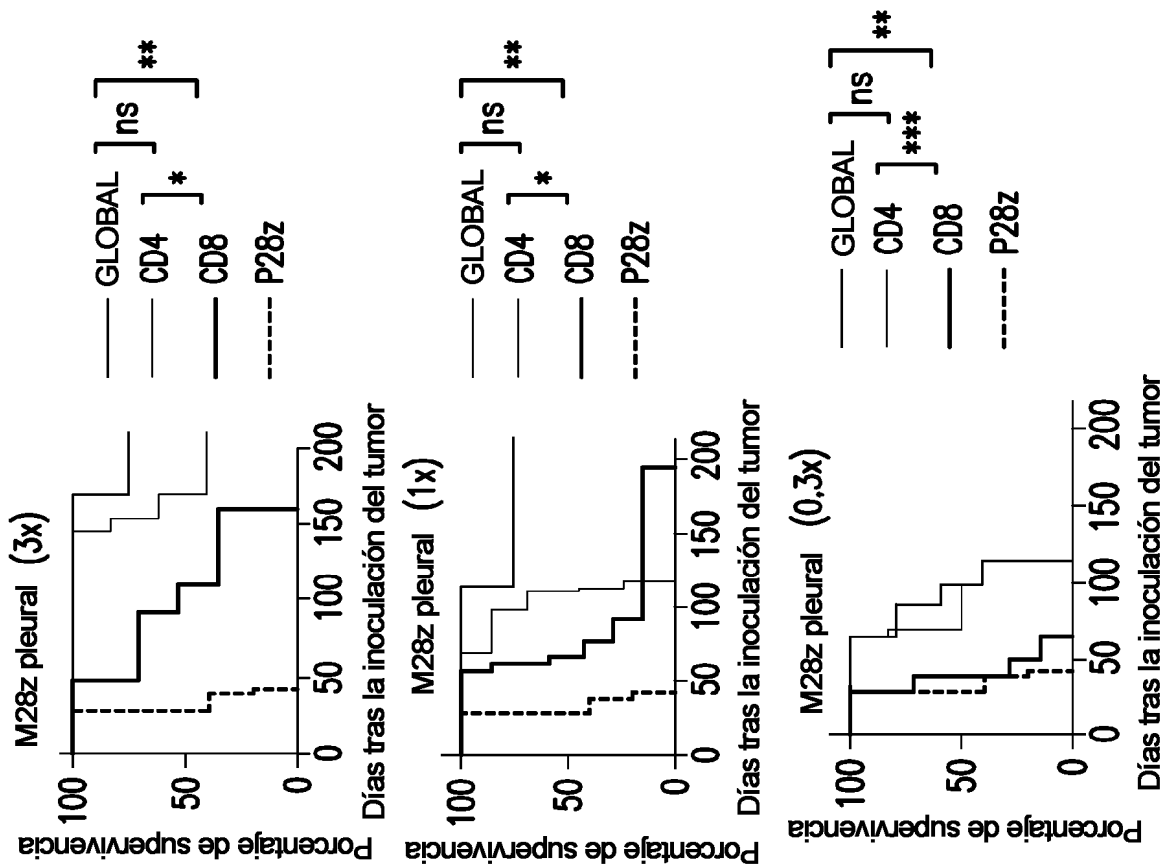


FIG. 42B

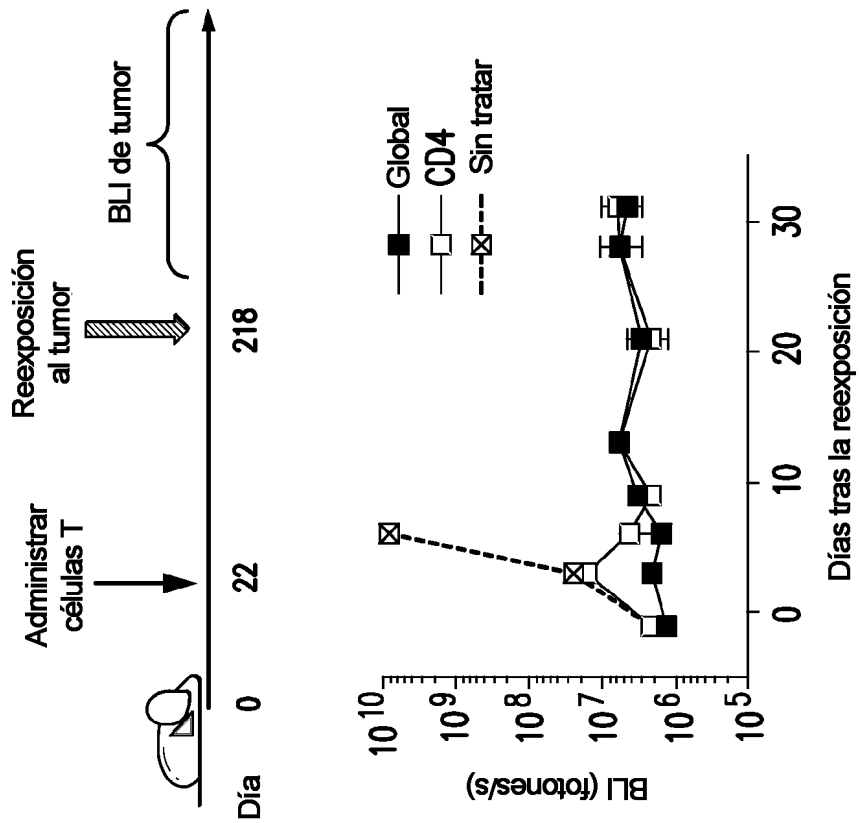


FIG. 42C

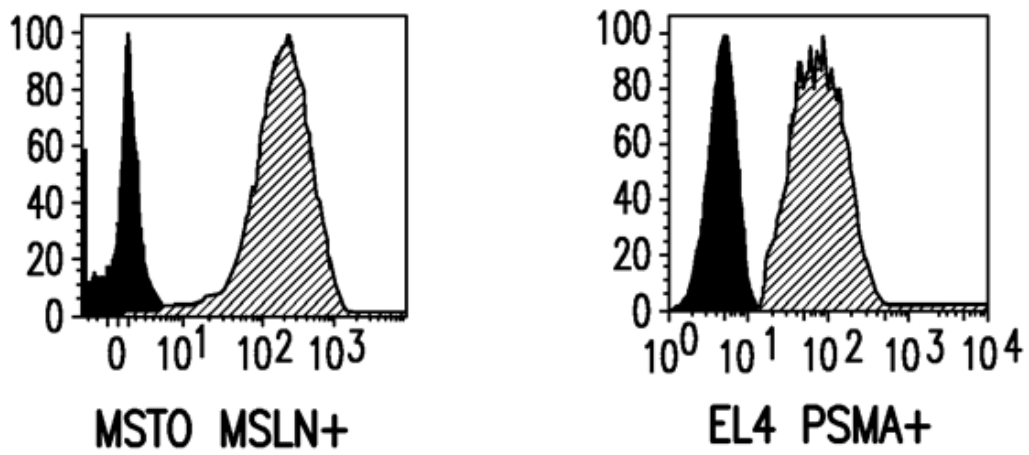


FIG. 43A

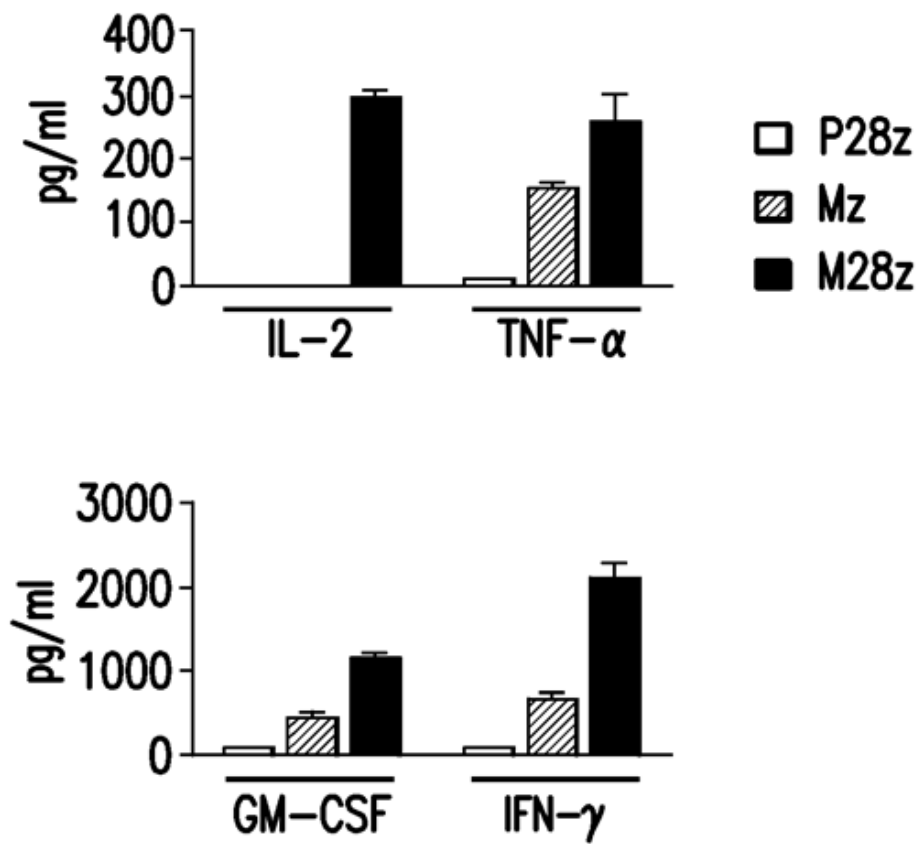


FIG. 43B

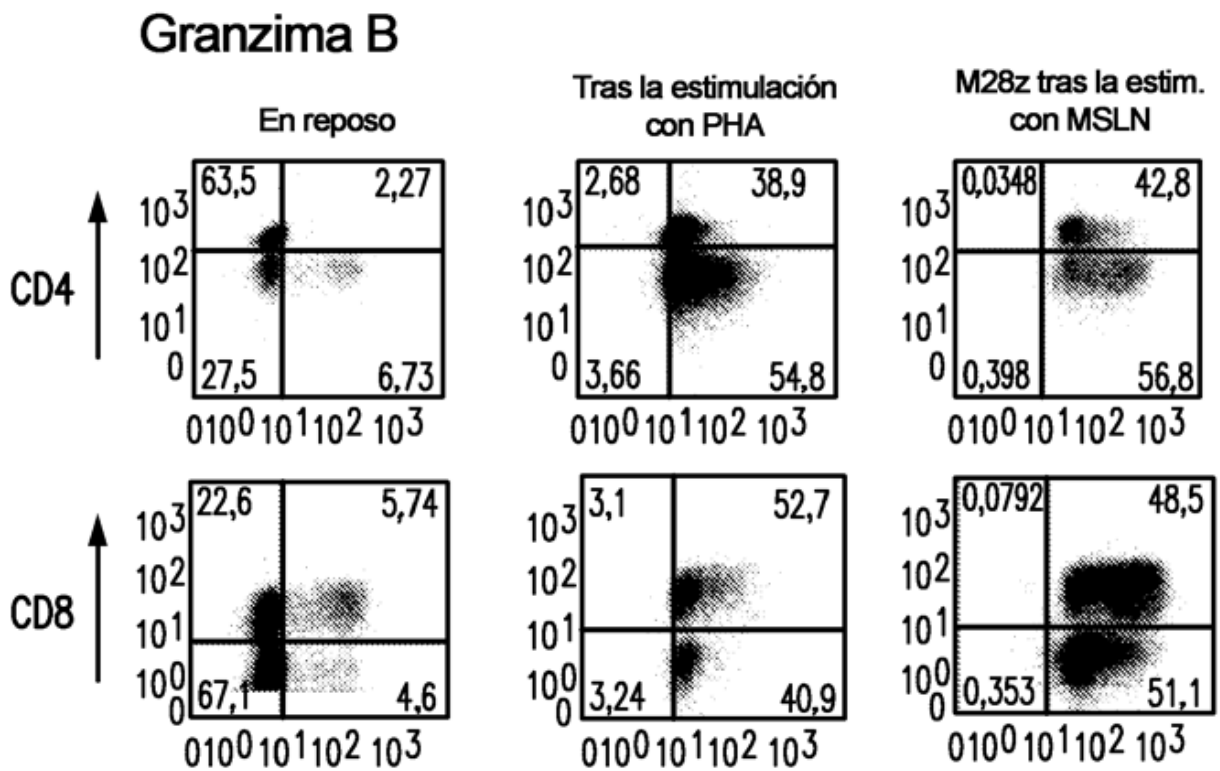
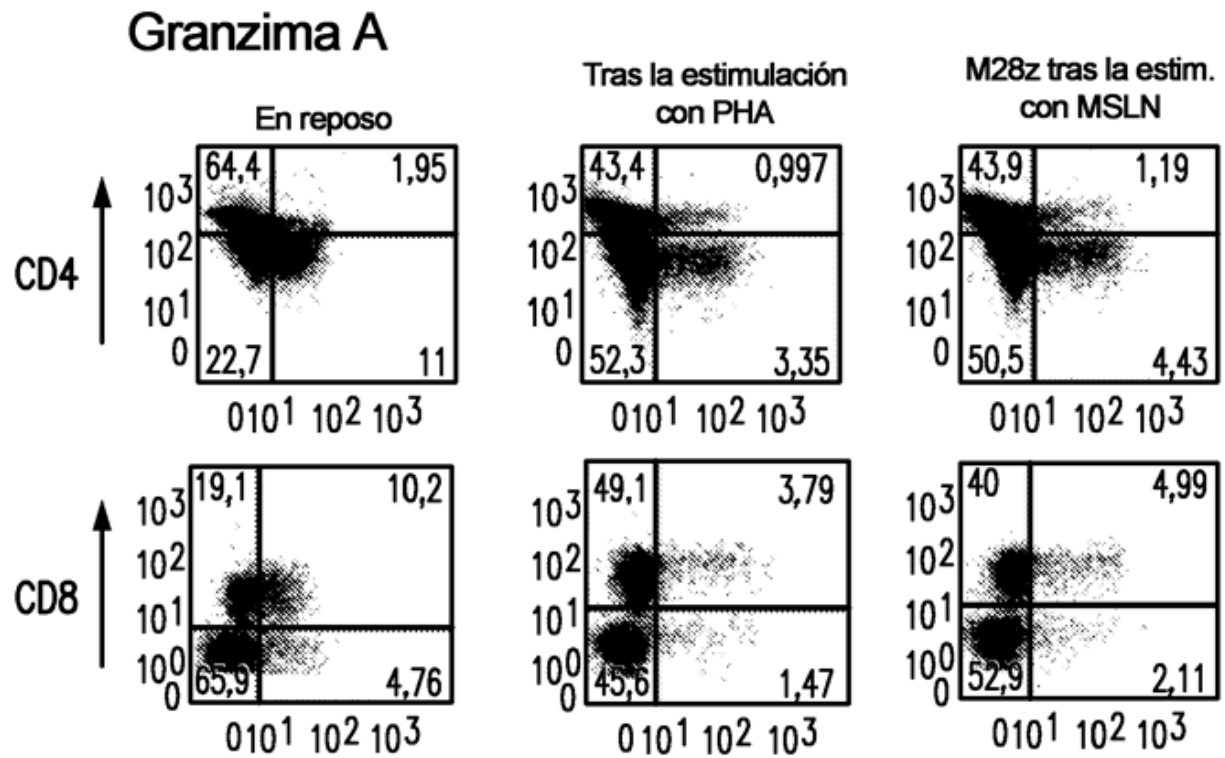


FIG. 44

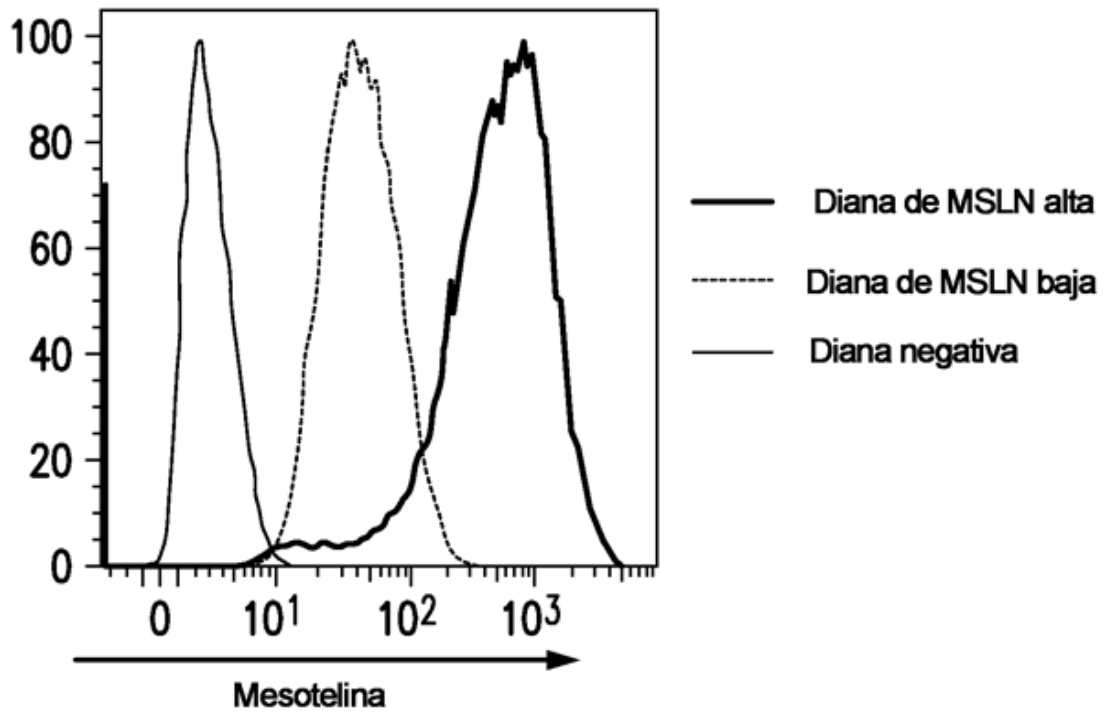


FIG. 45A

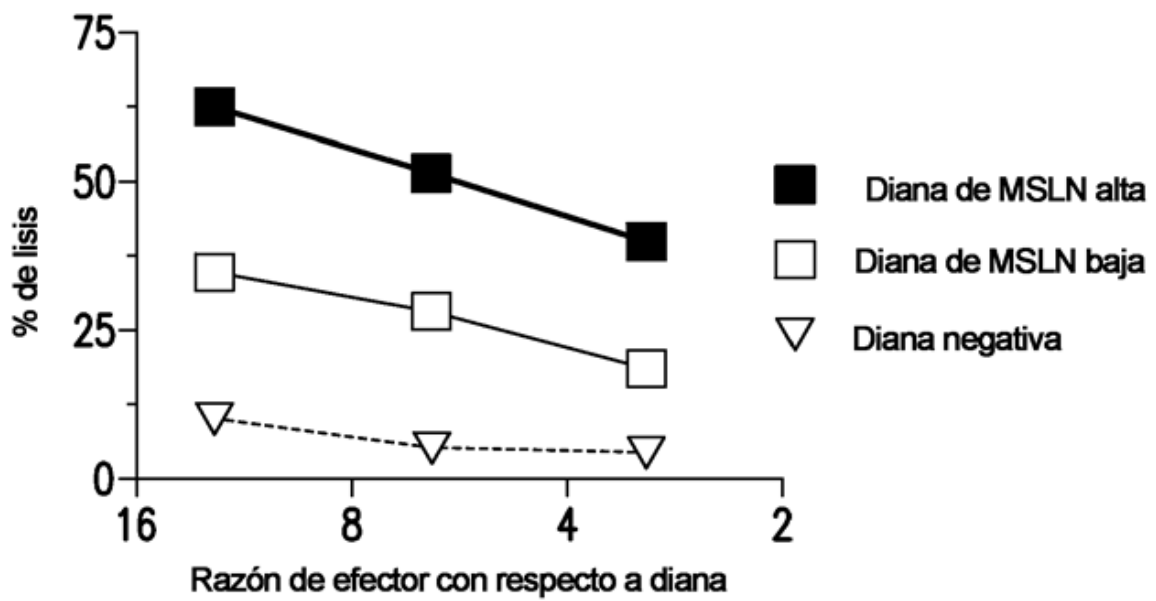


FIG. 45B

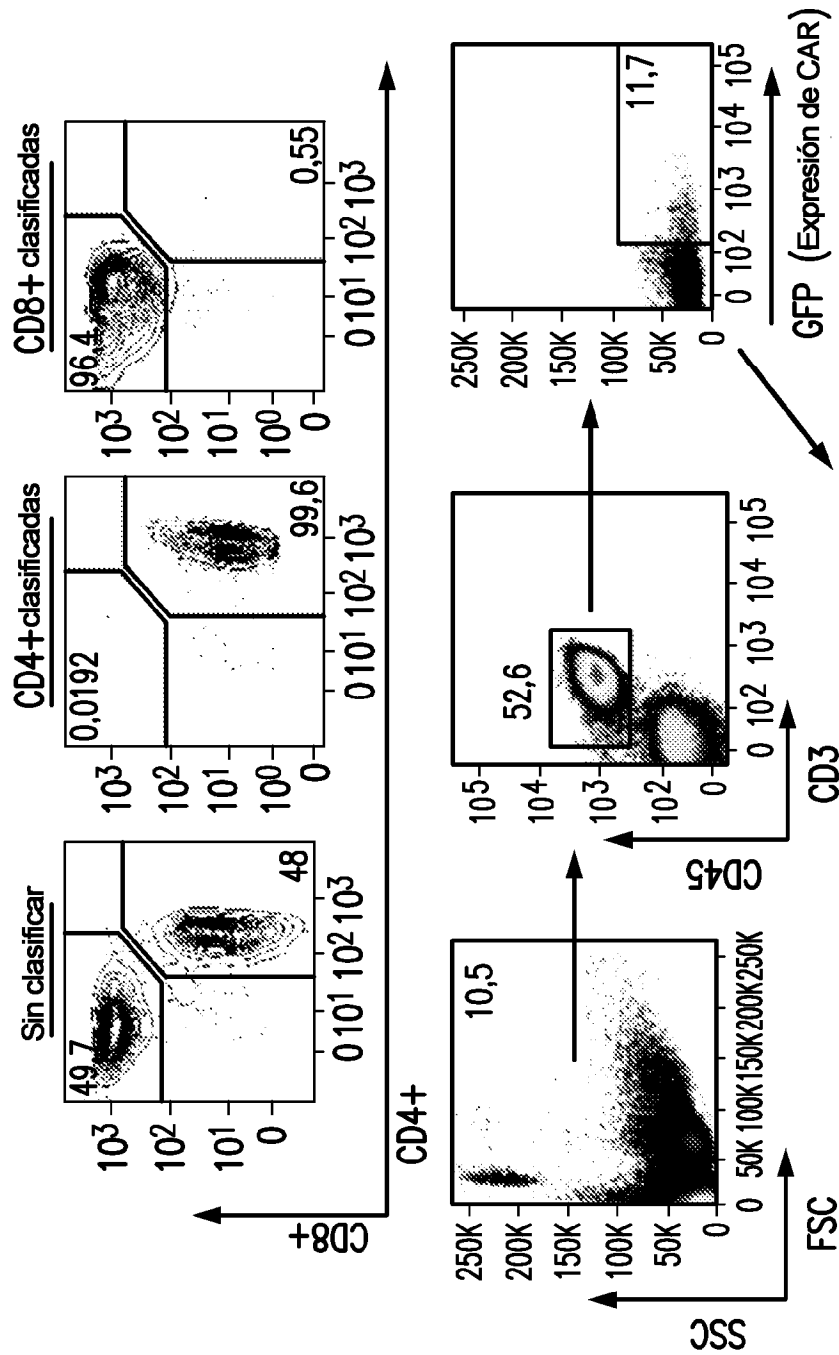


FIG. 46A

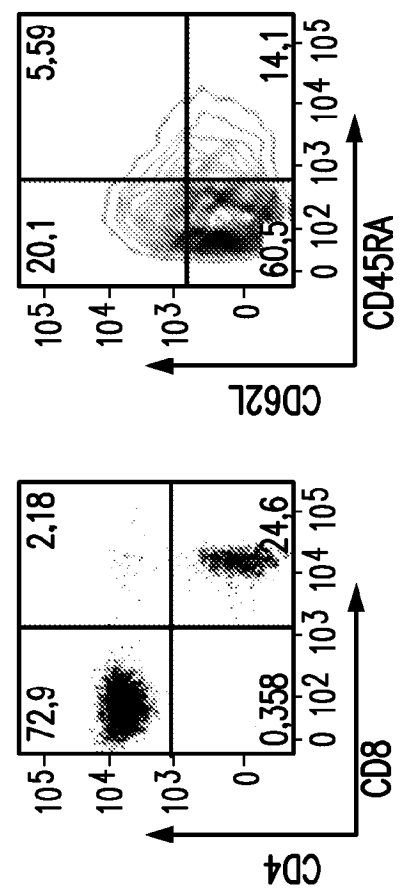


FIG. 46B

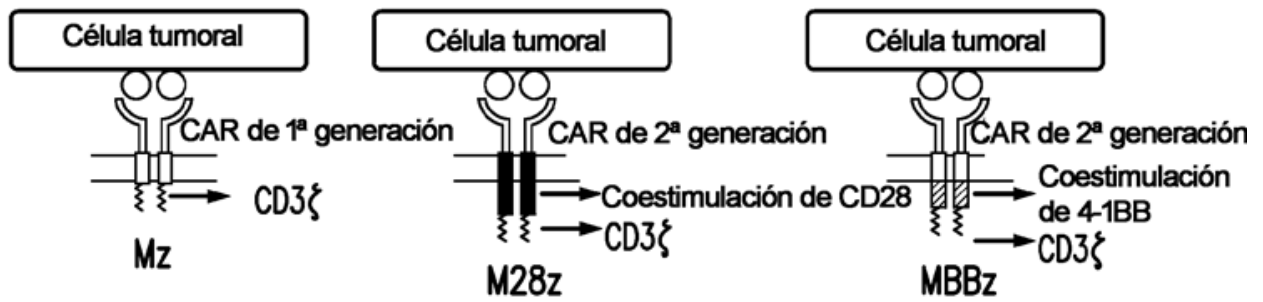


FIG. 47A

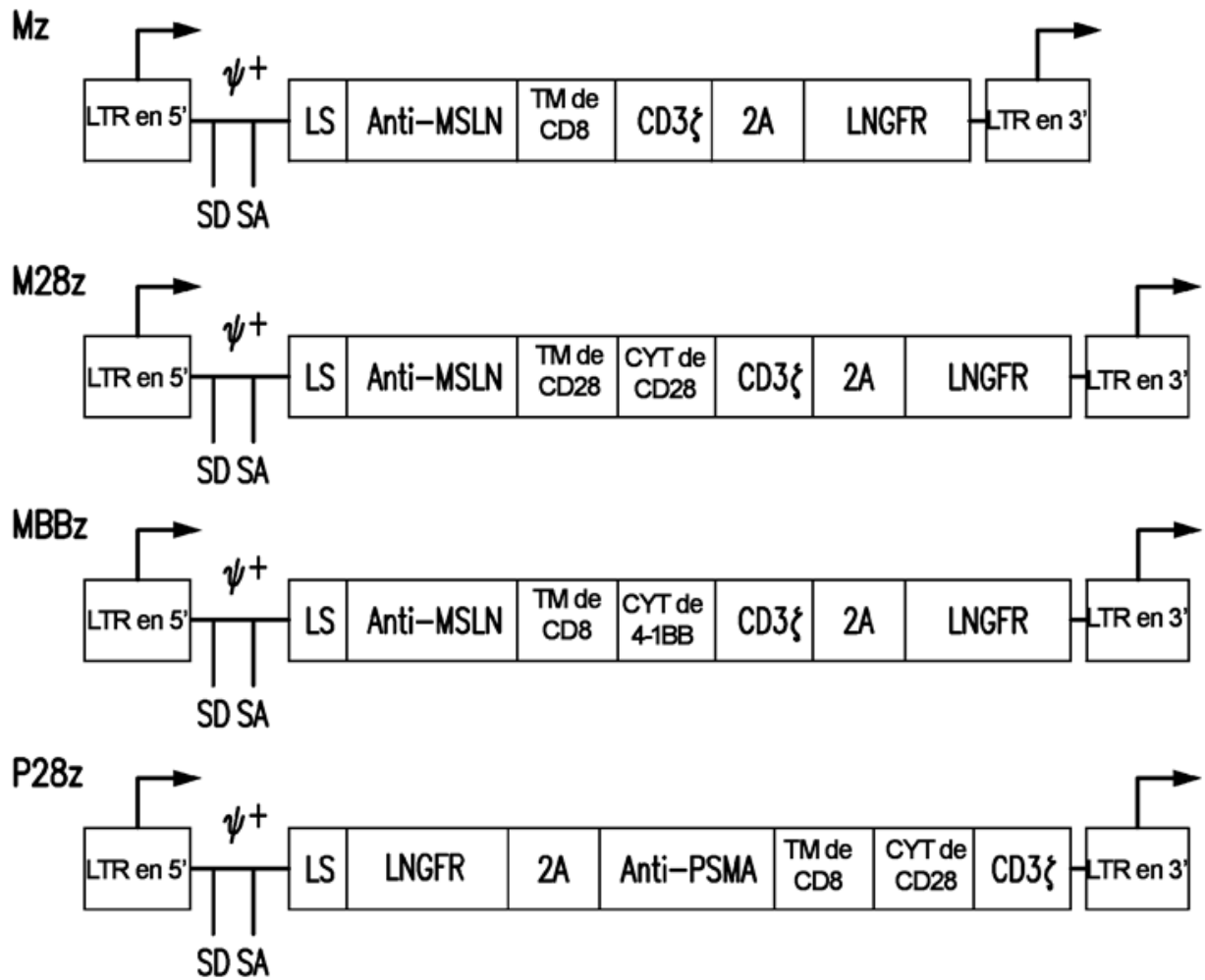


FIG. 47B

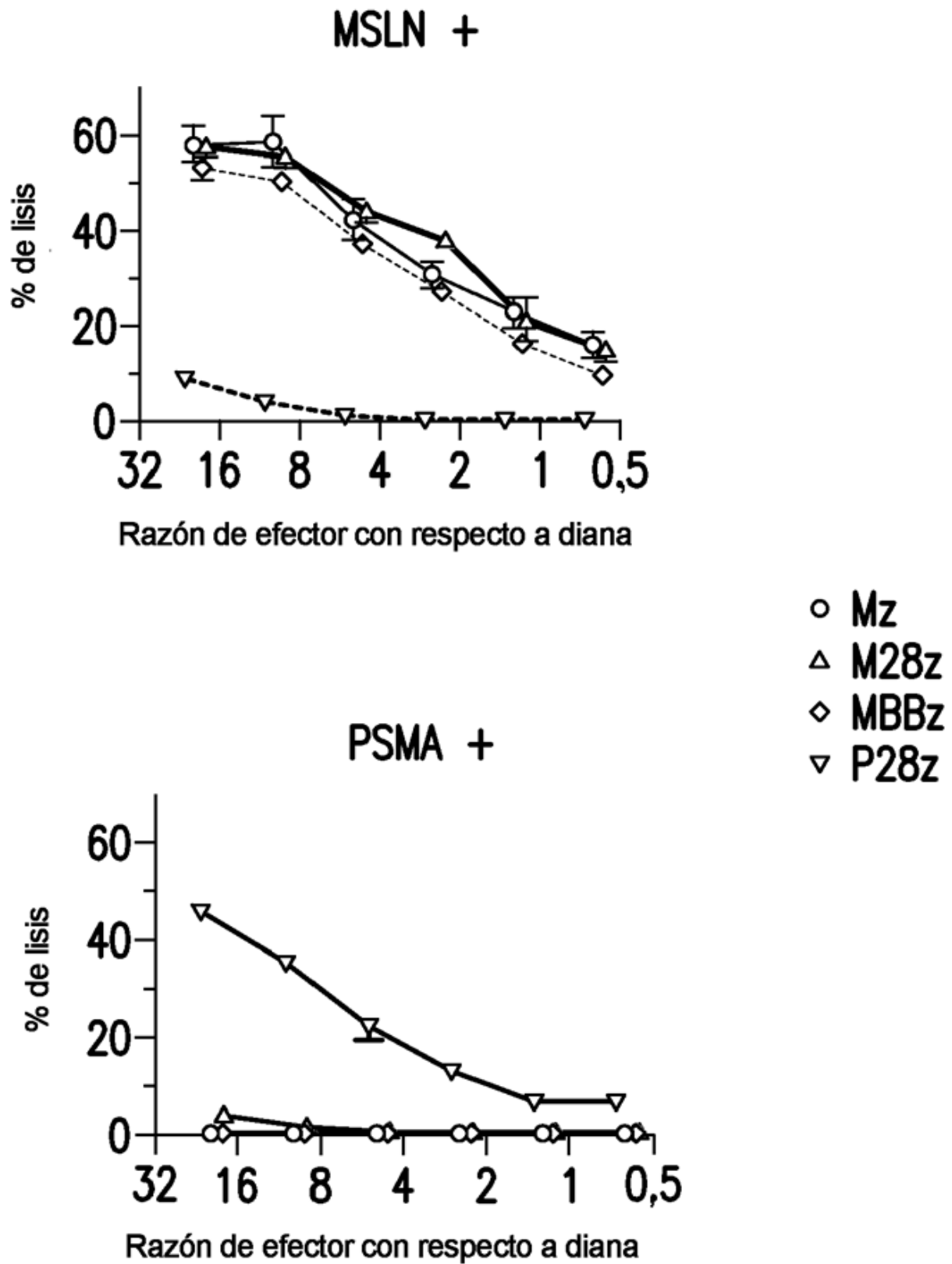


FIG. 47C

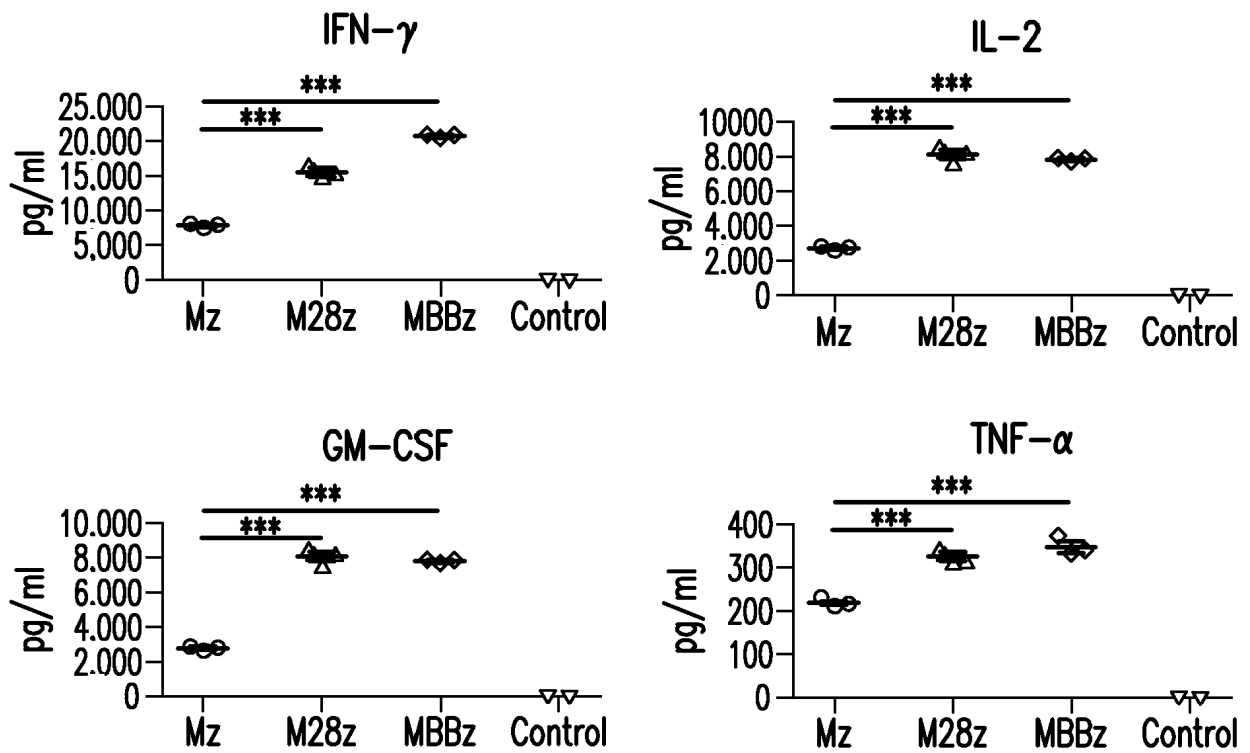


FIG. 47D

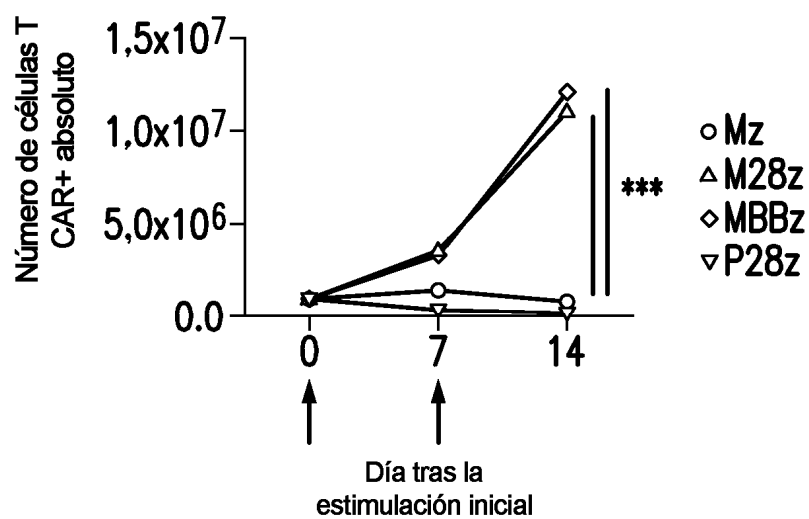


FIG. 47E

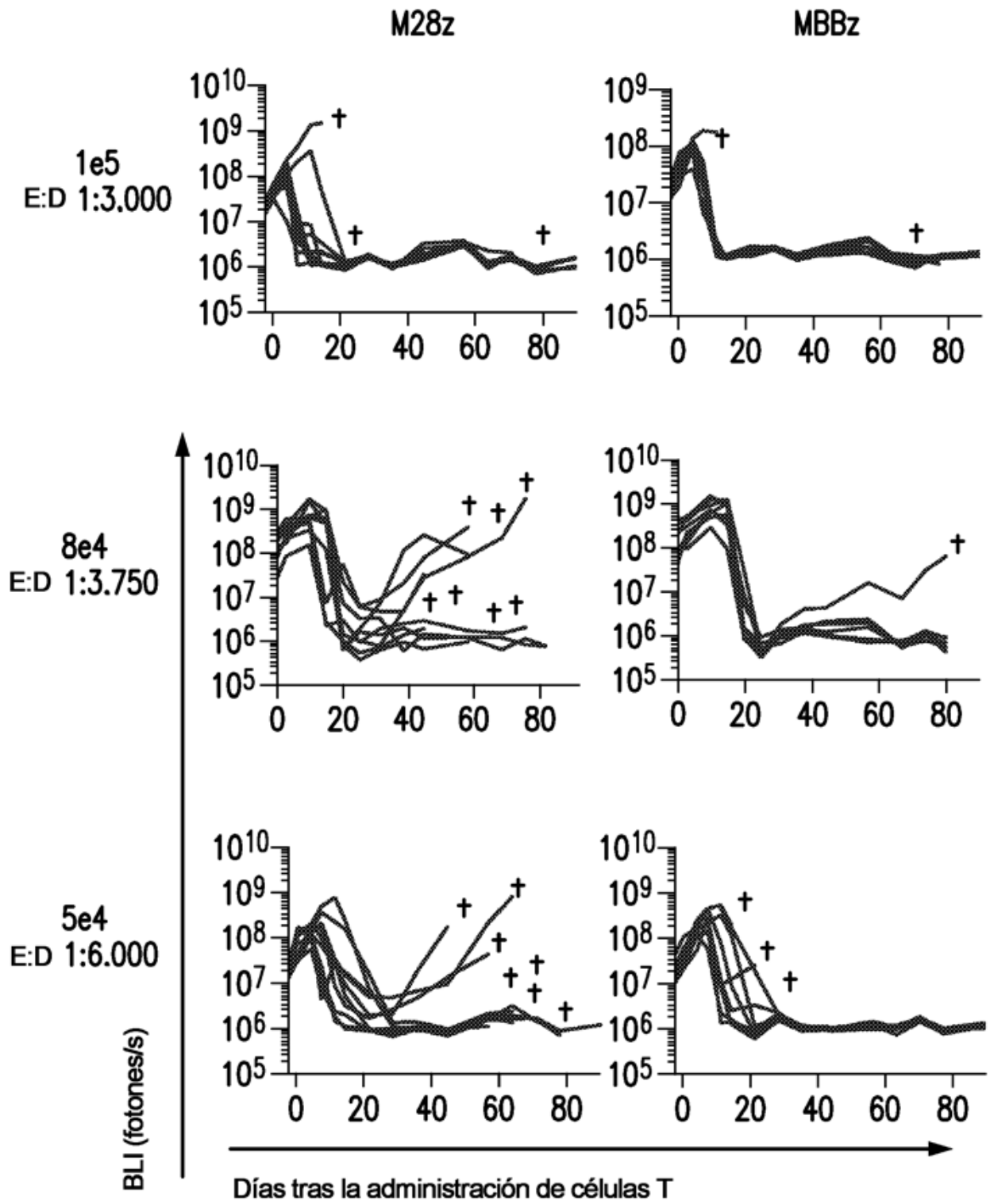
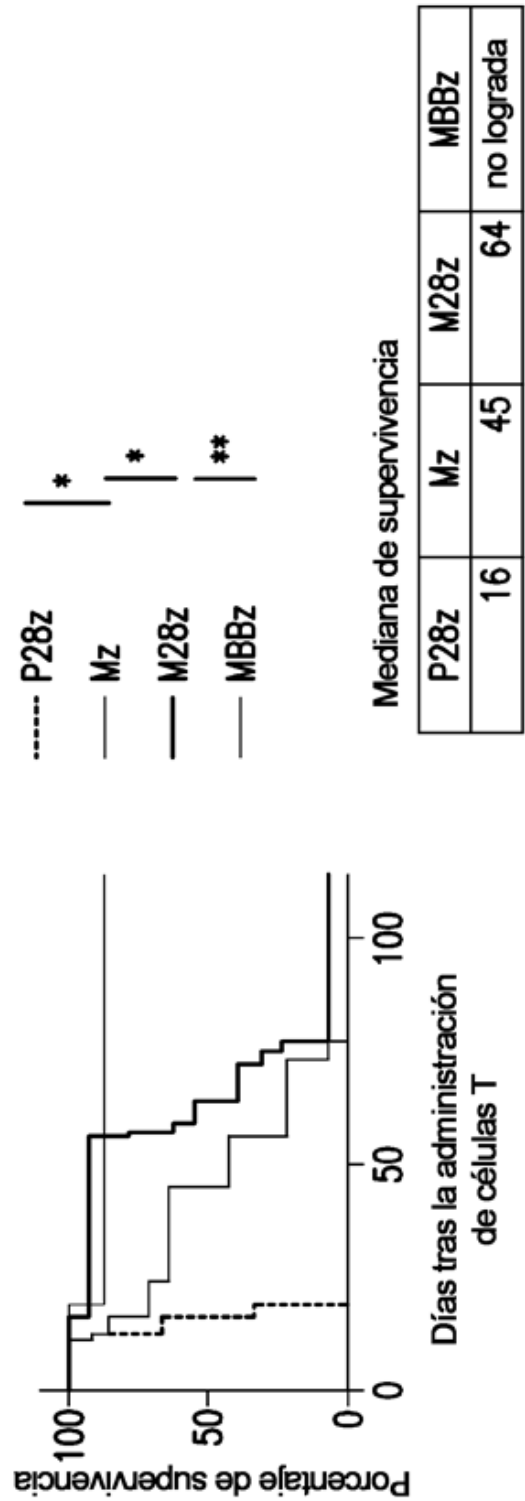
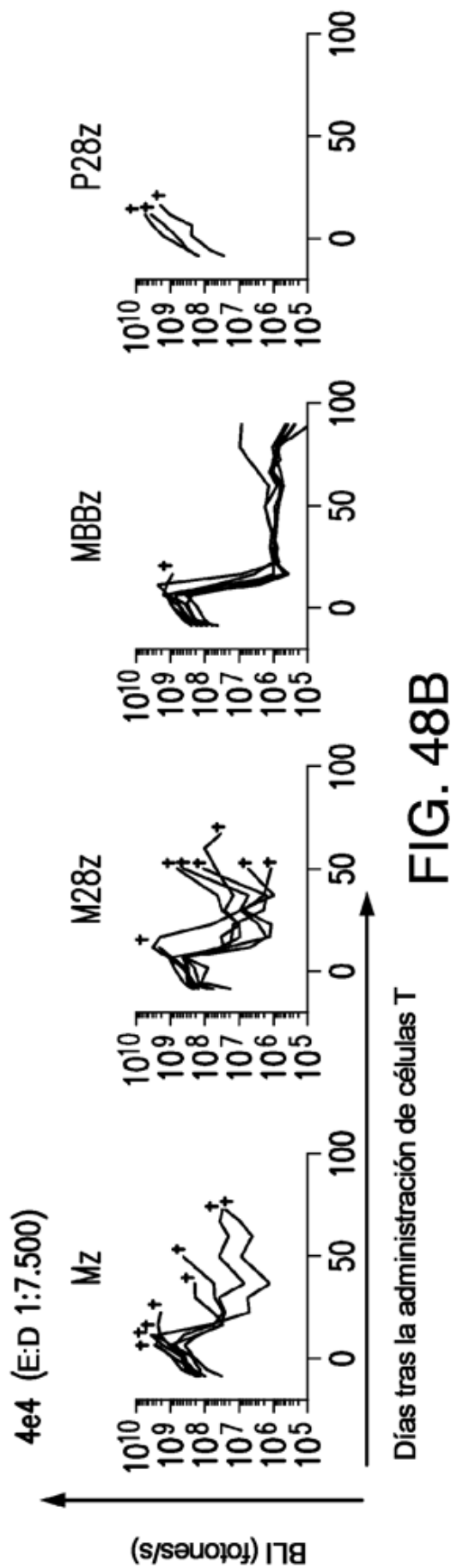


FIG. 48A



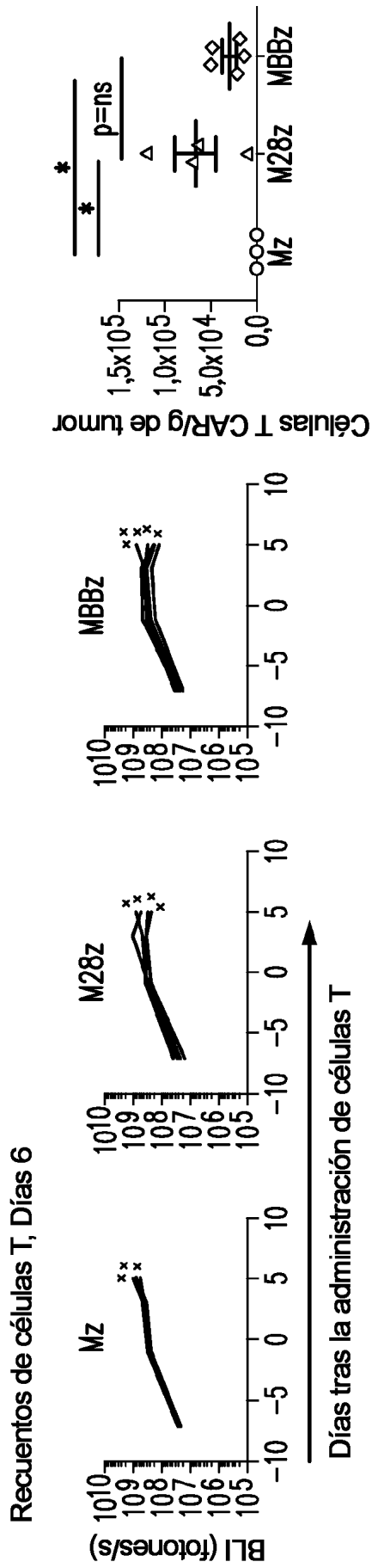


FIG. 49A

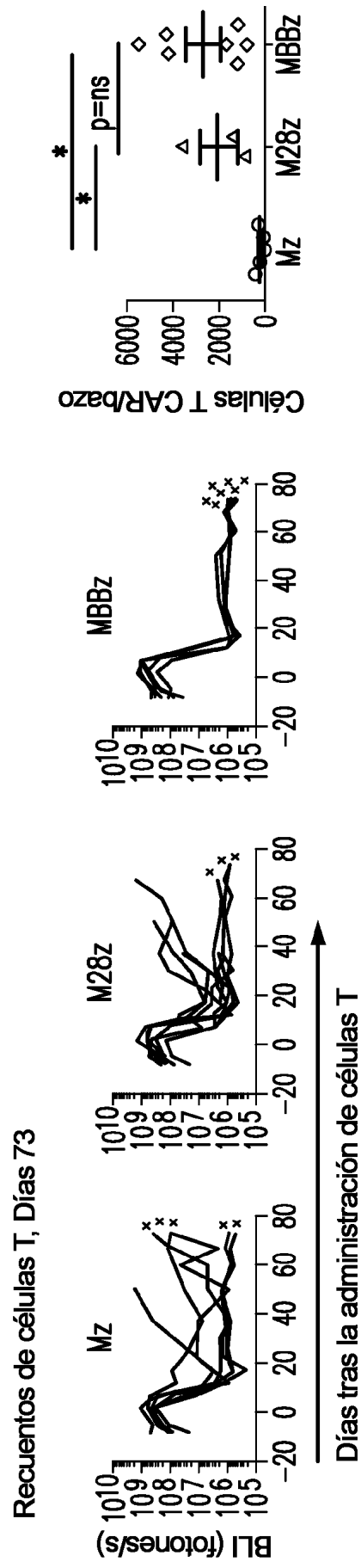


FIG. 49B

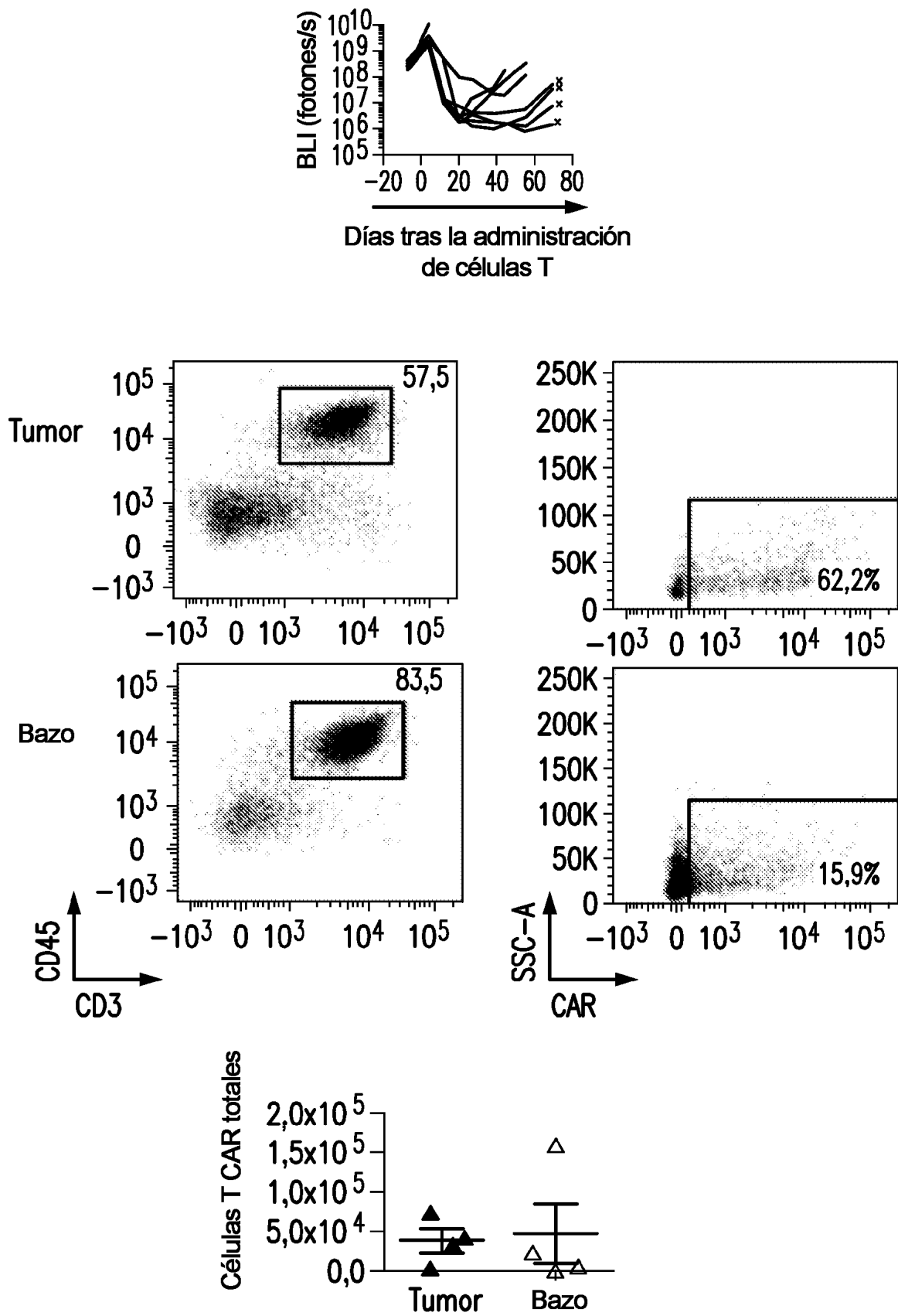


FIG. 49C

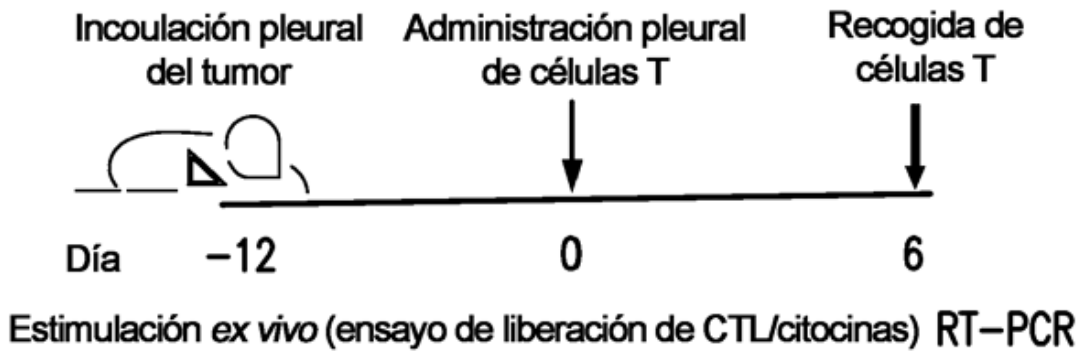


FIG. 50A

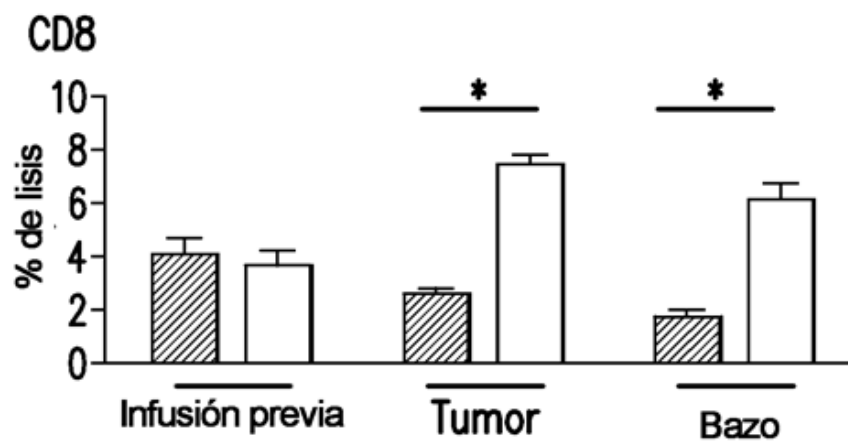
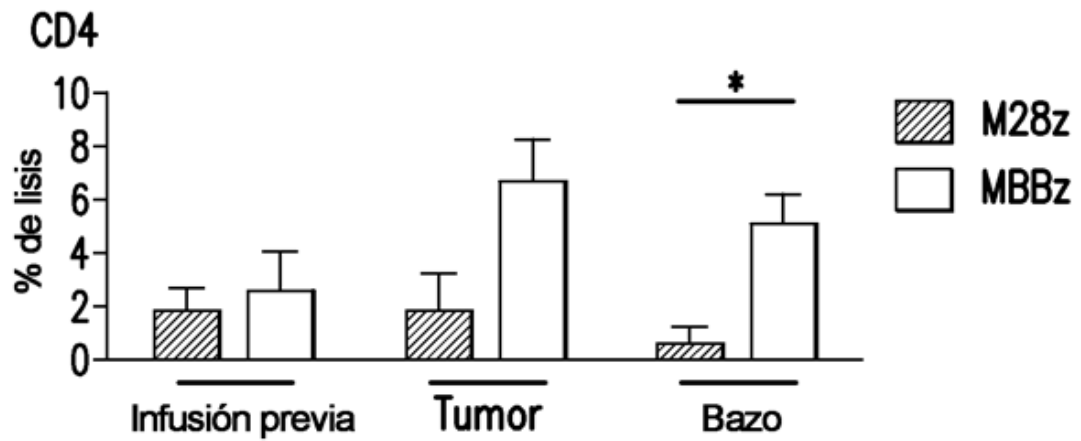


FIG. 50B

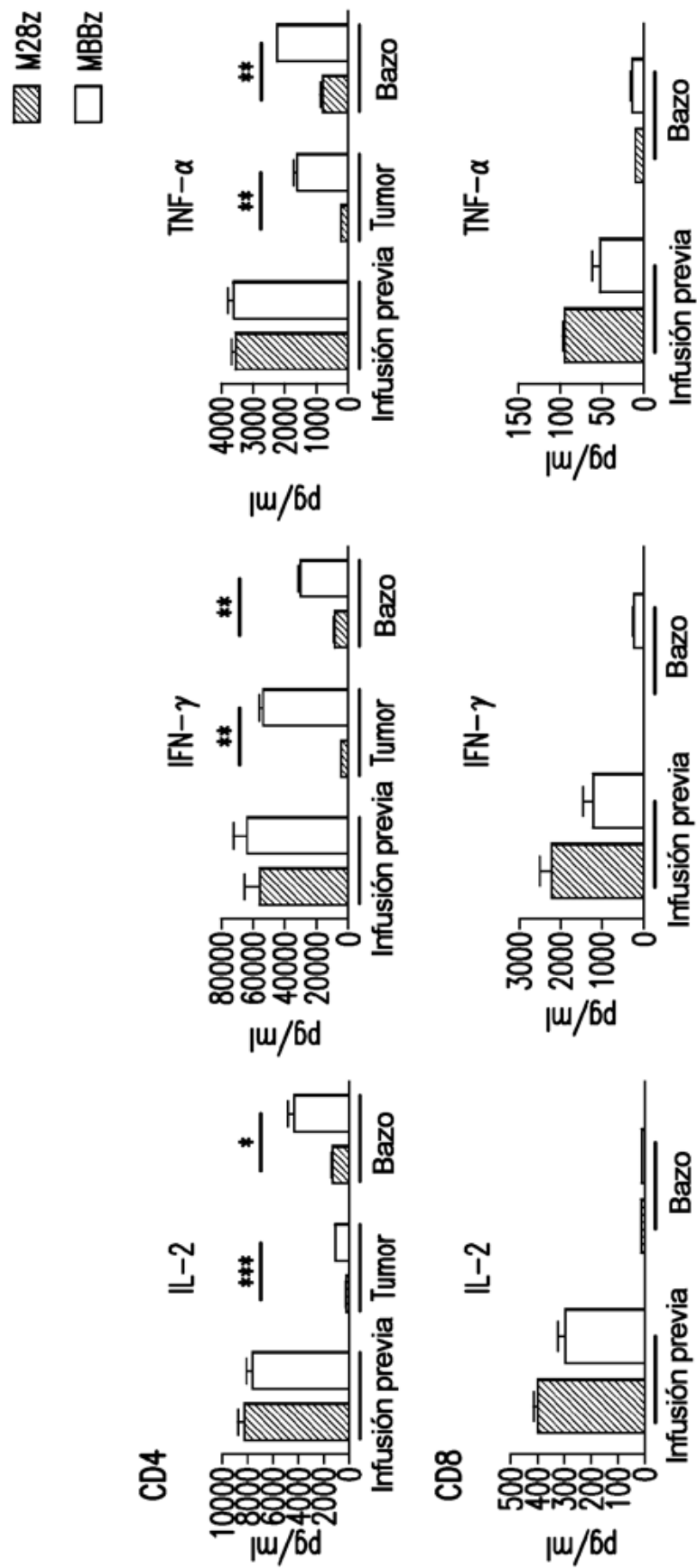


FIG. 50C

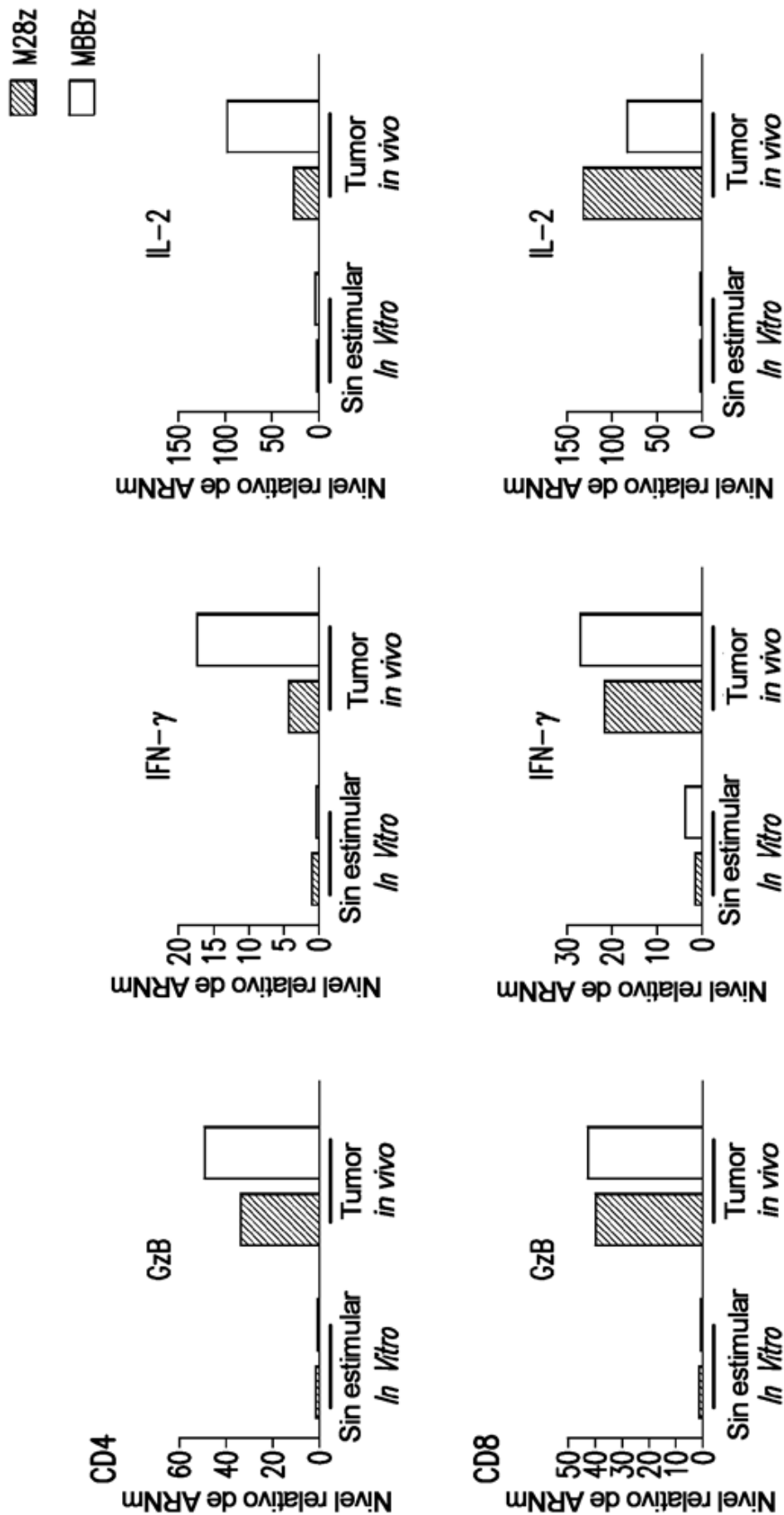


FIG. 50D

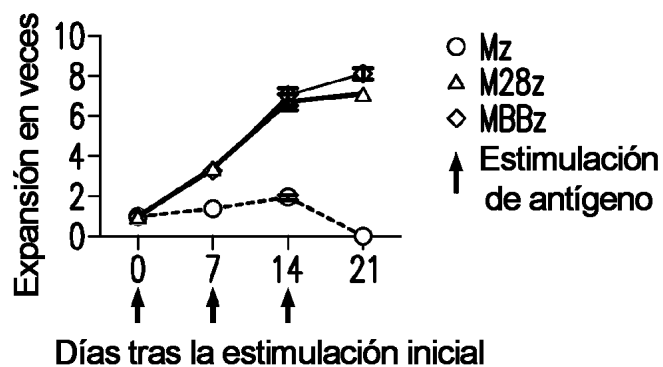


FIG. 51A

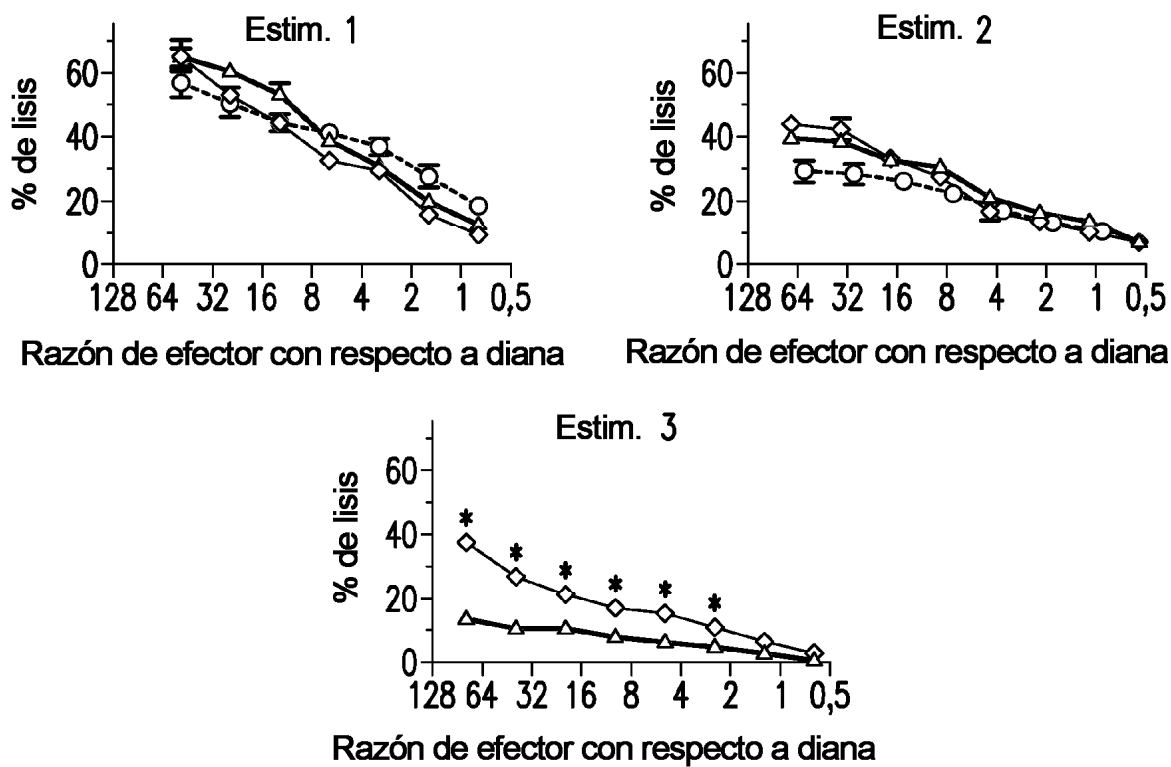


FIG. 51B

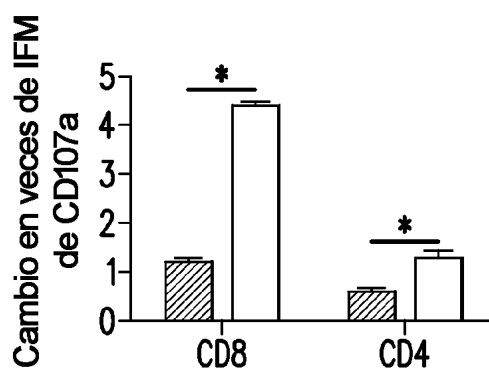


FIG. 51C

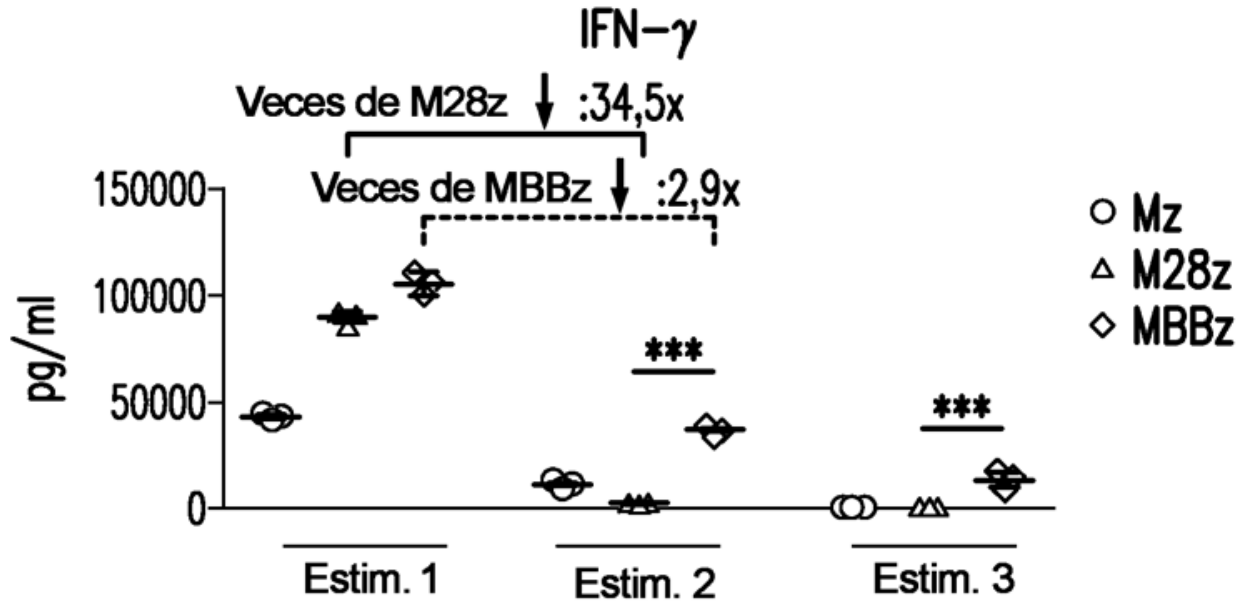
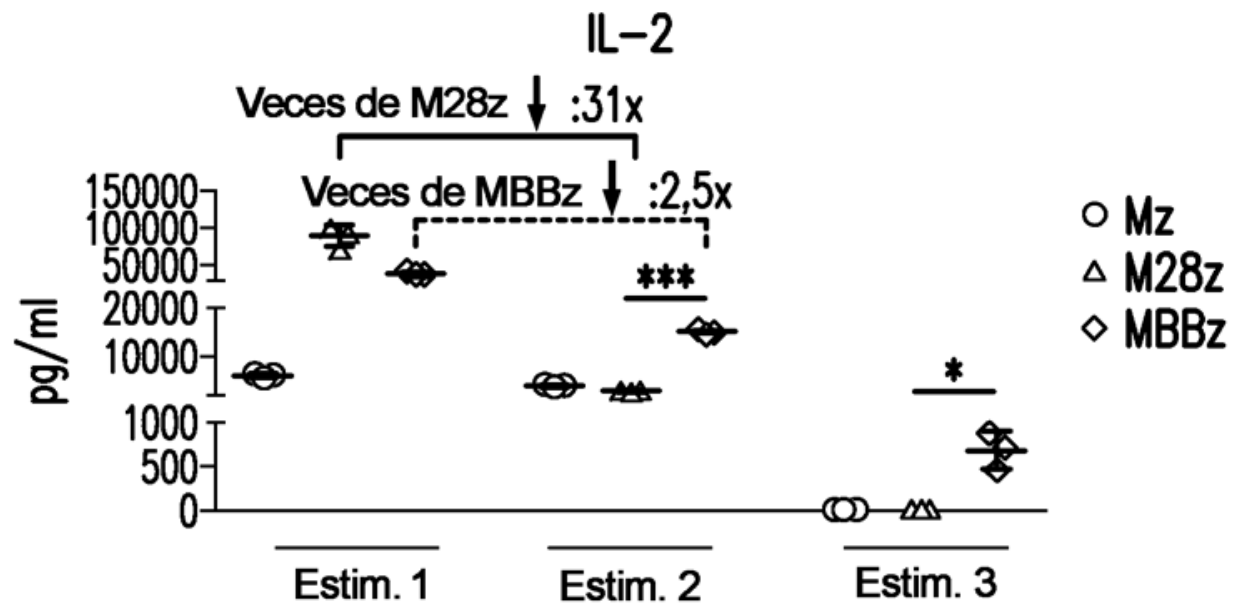


FIG. 51D

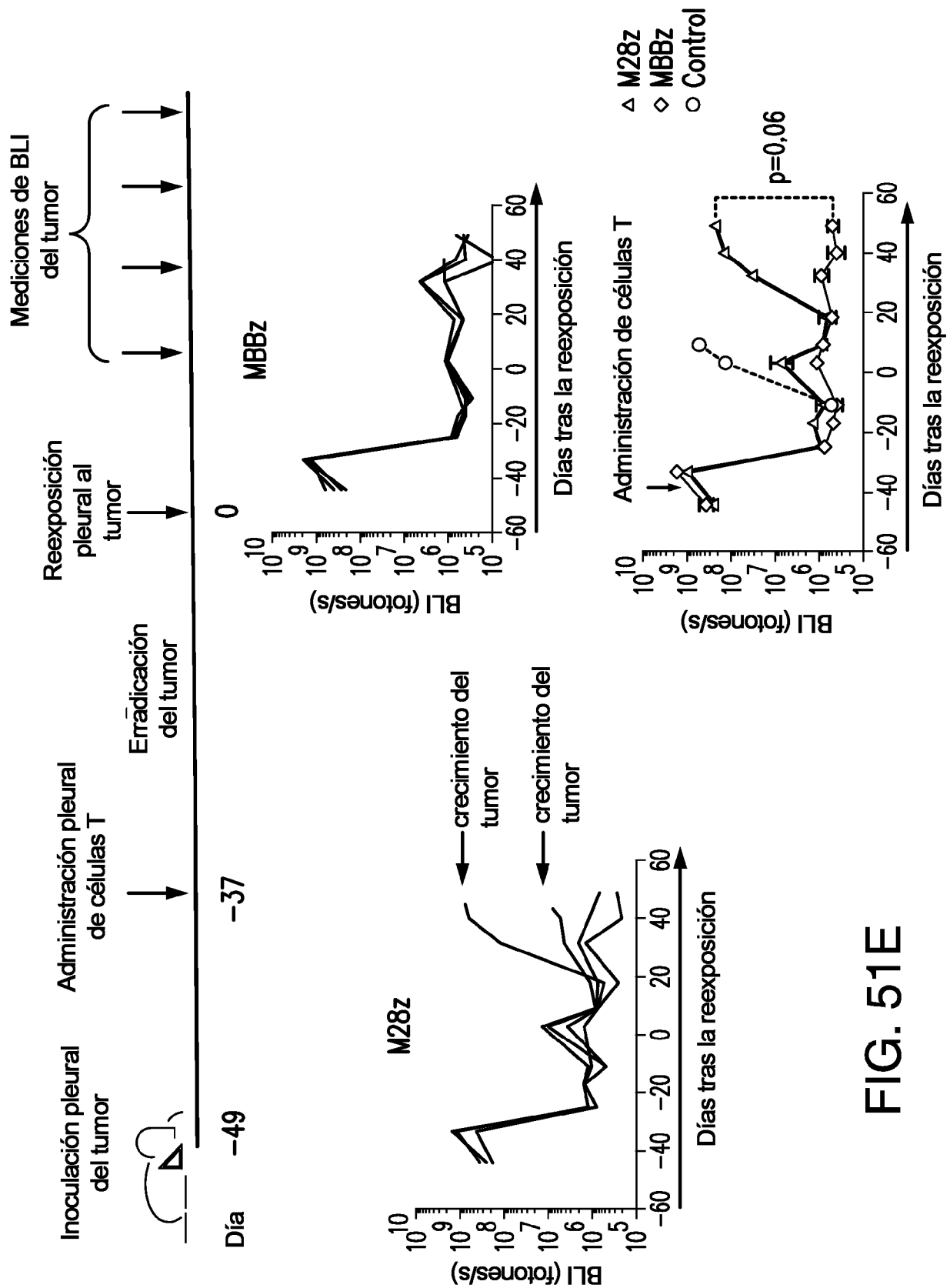


FIG. 51E

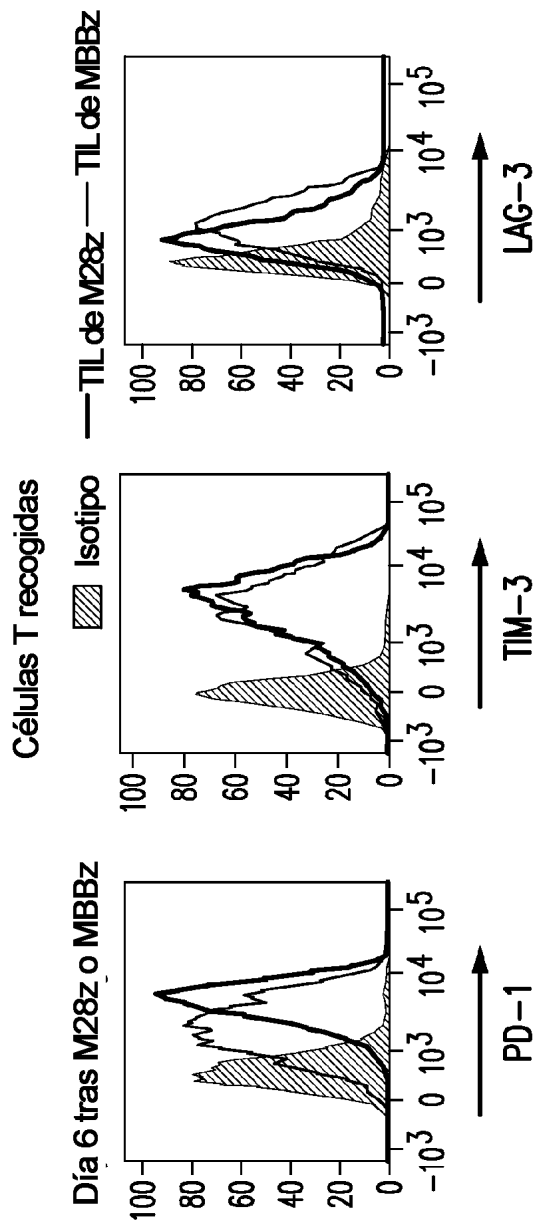


FIG. 52A

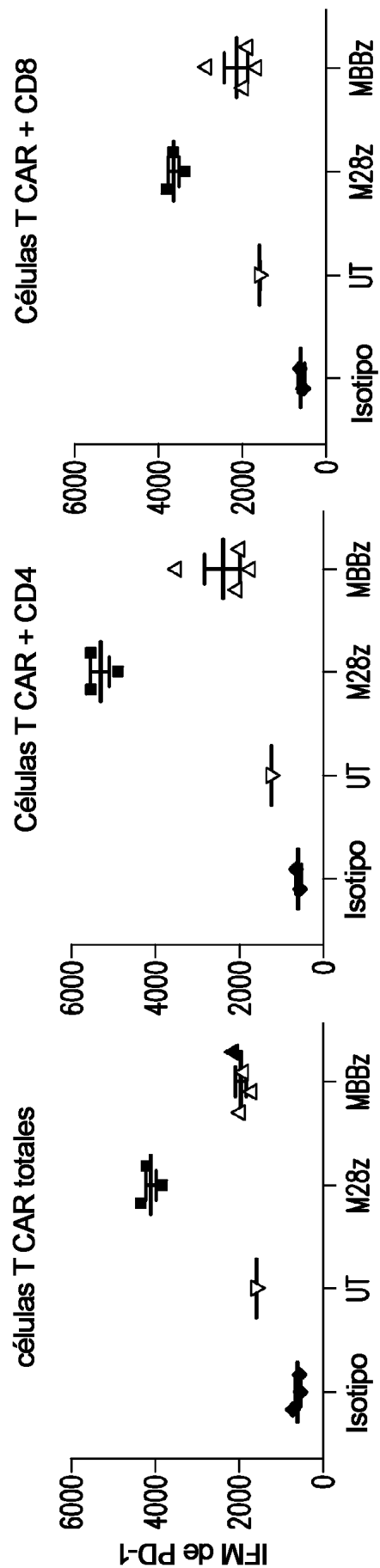


FIG. 52B

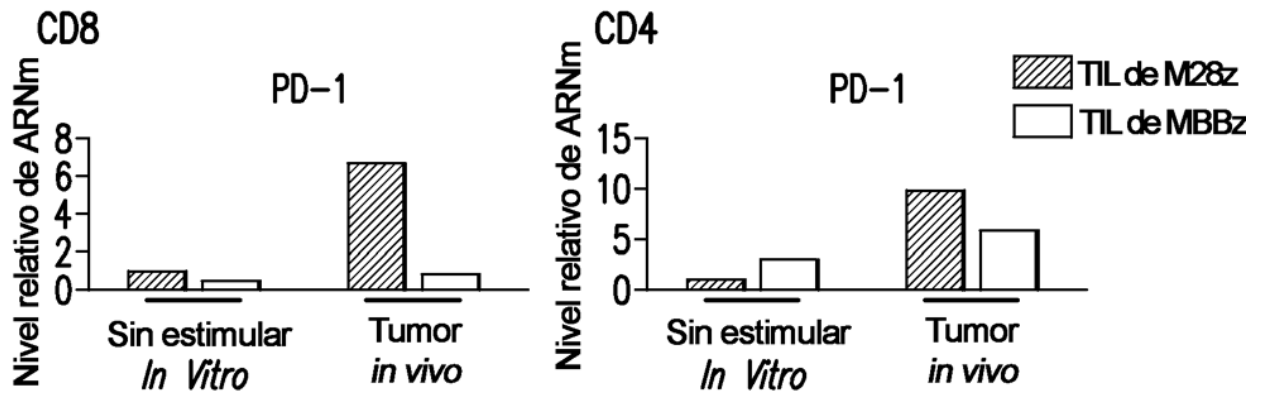


FIG. 52C

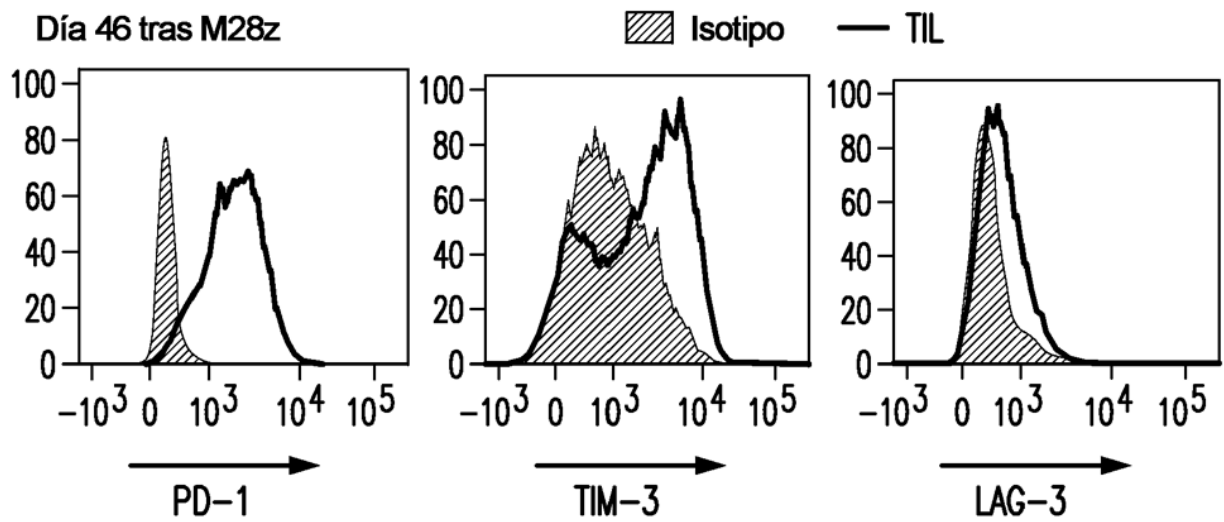


FIG. 52D

Células tumorales
In vivo

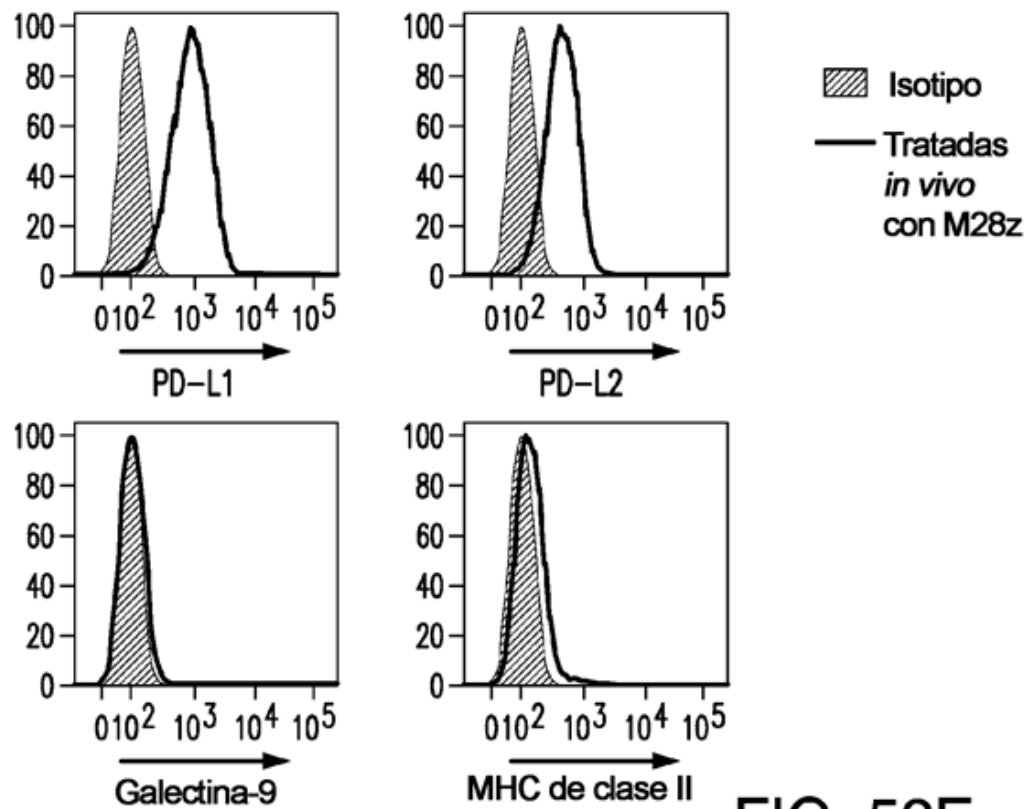


FIG. 52E

In vitro

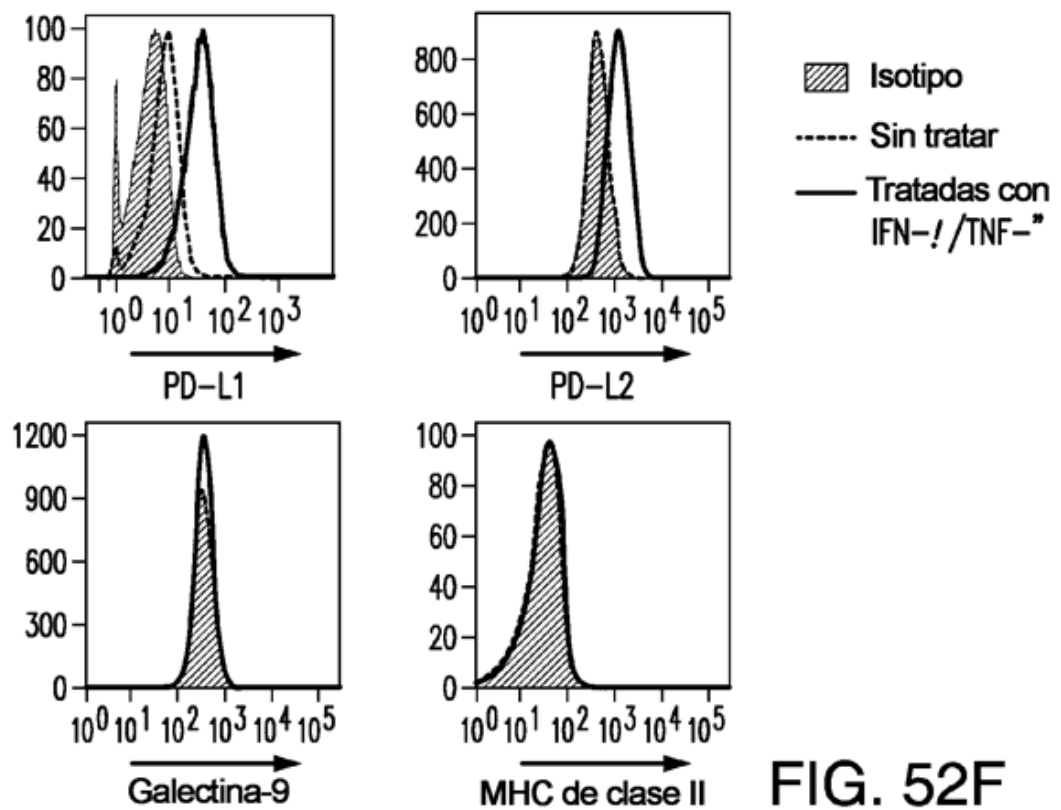


FIG. 52F

3T3 diana

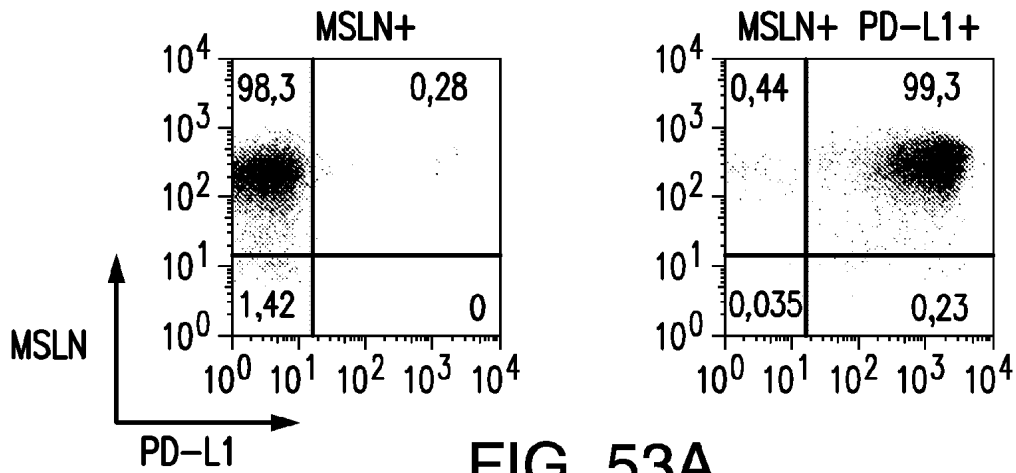


FIG. 53A

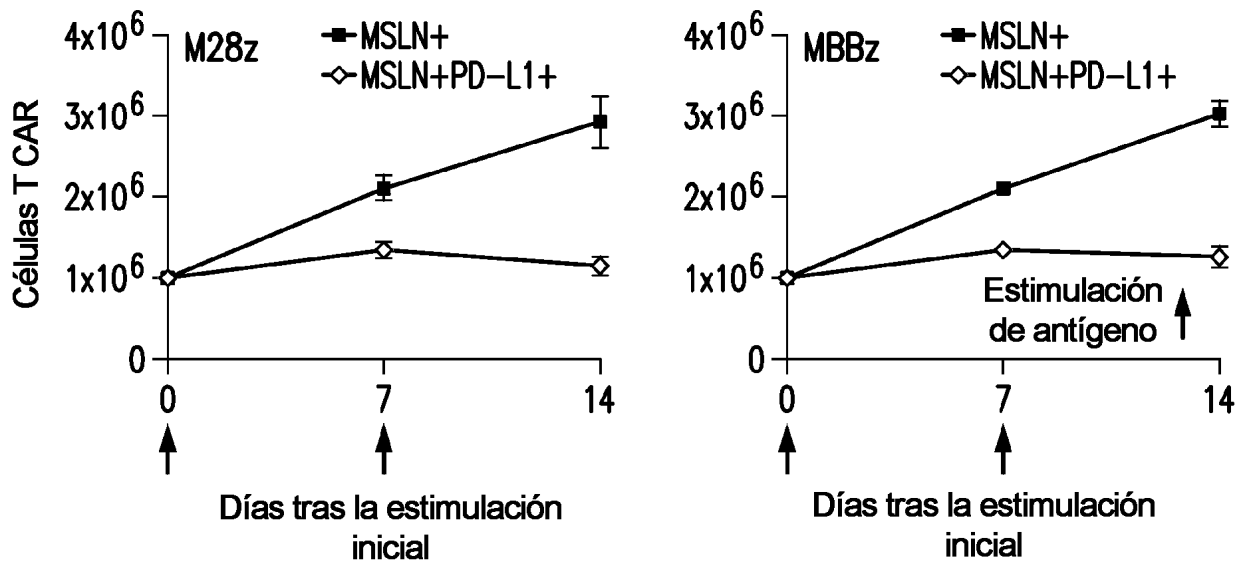


FIG. 53B

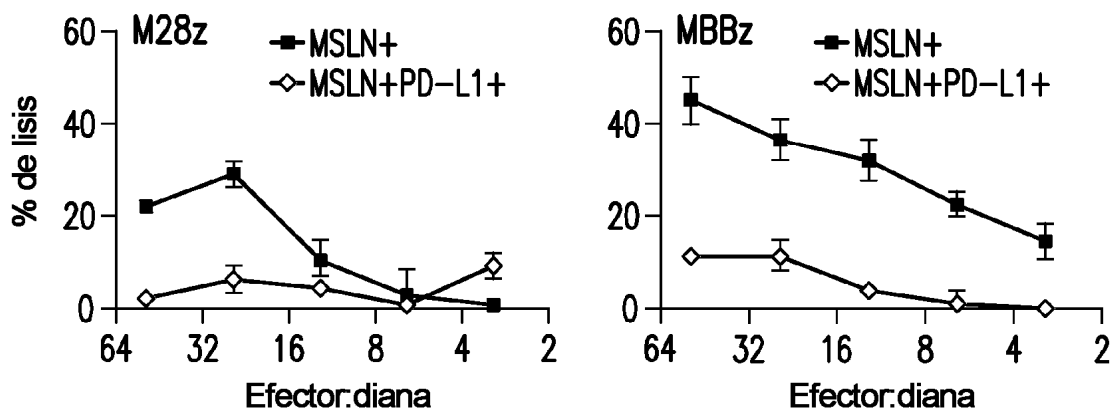


FIG. 53C

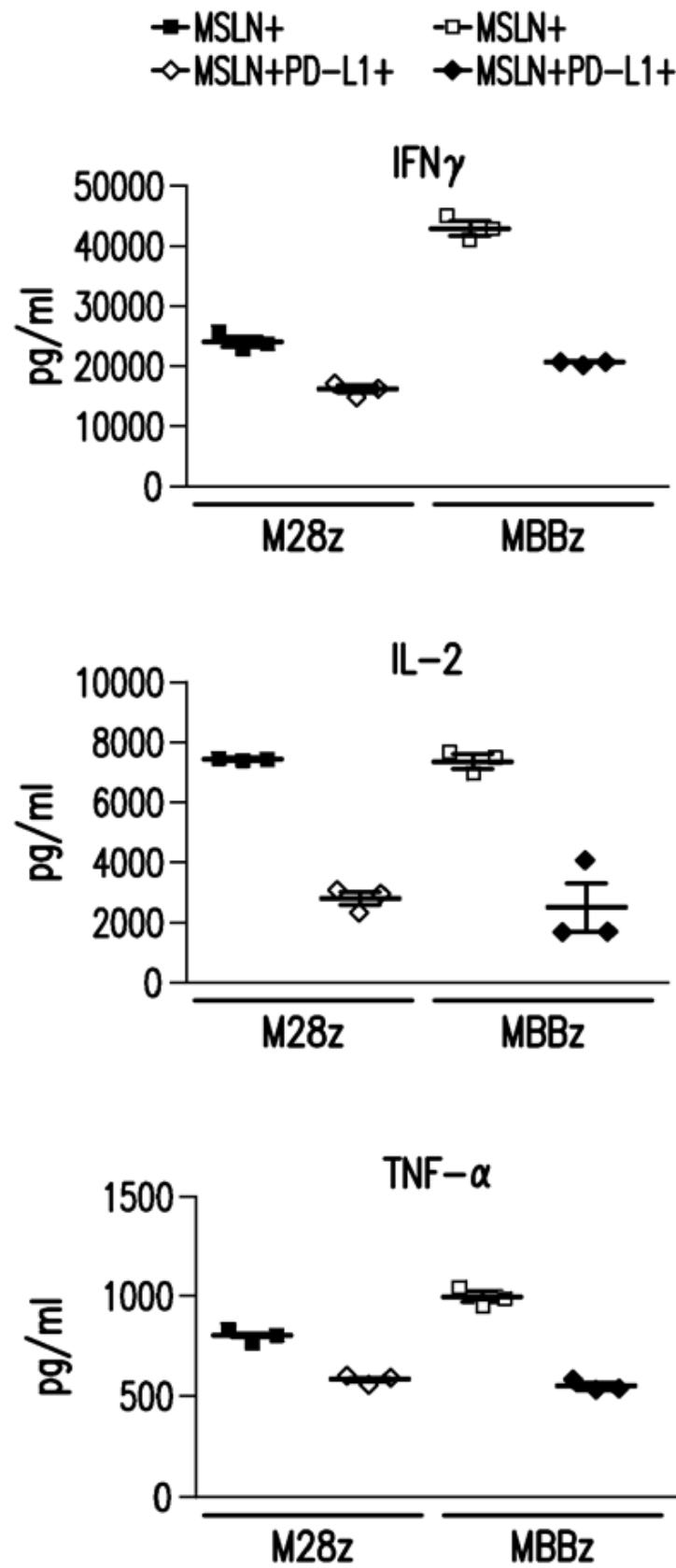


FIG. 53D

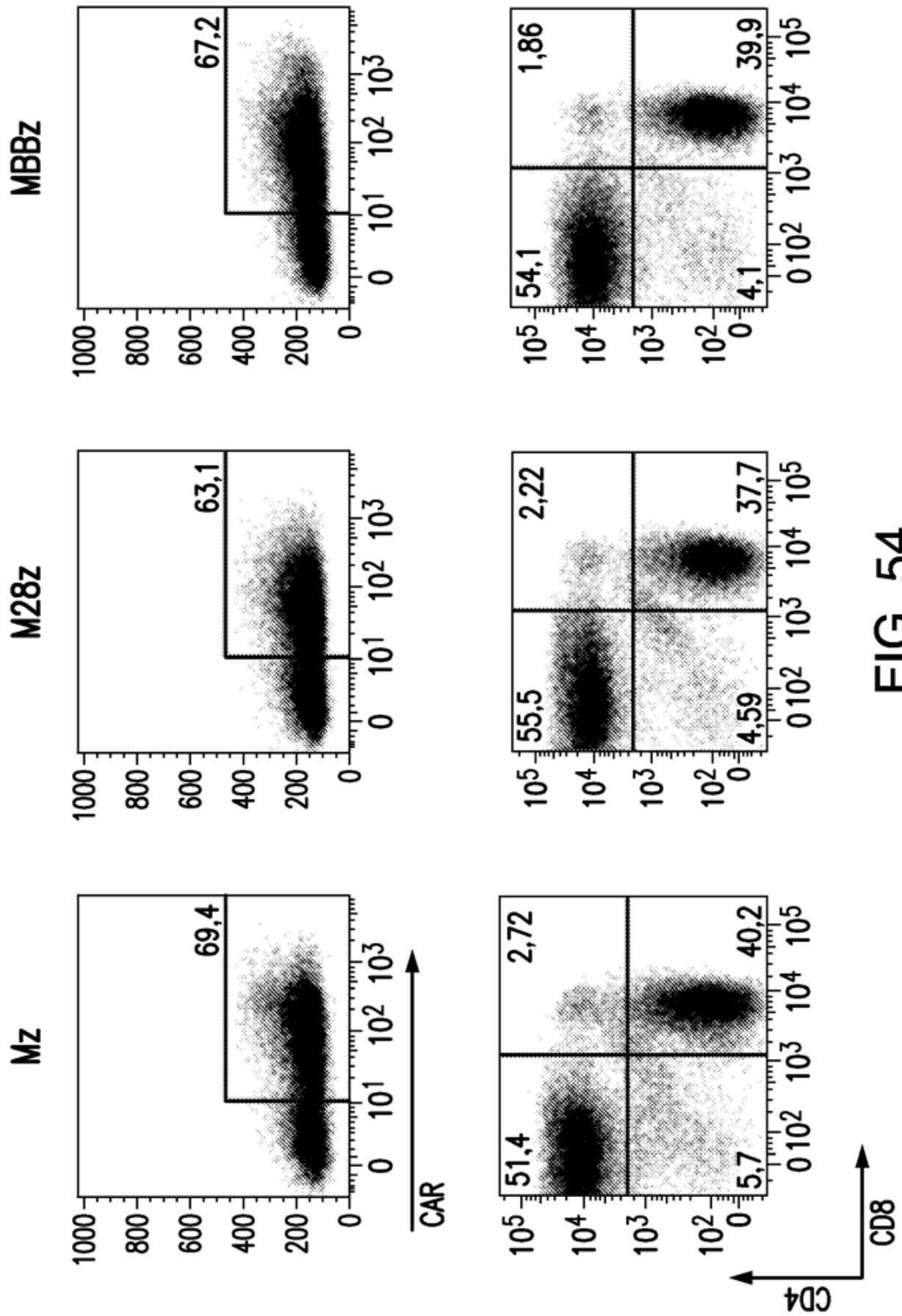


FIG. 54

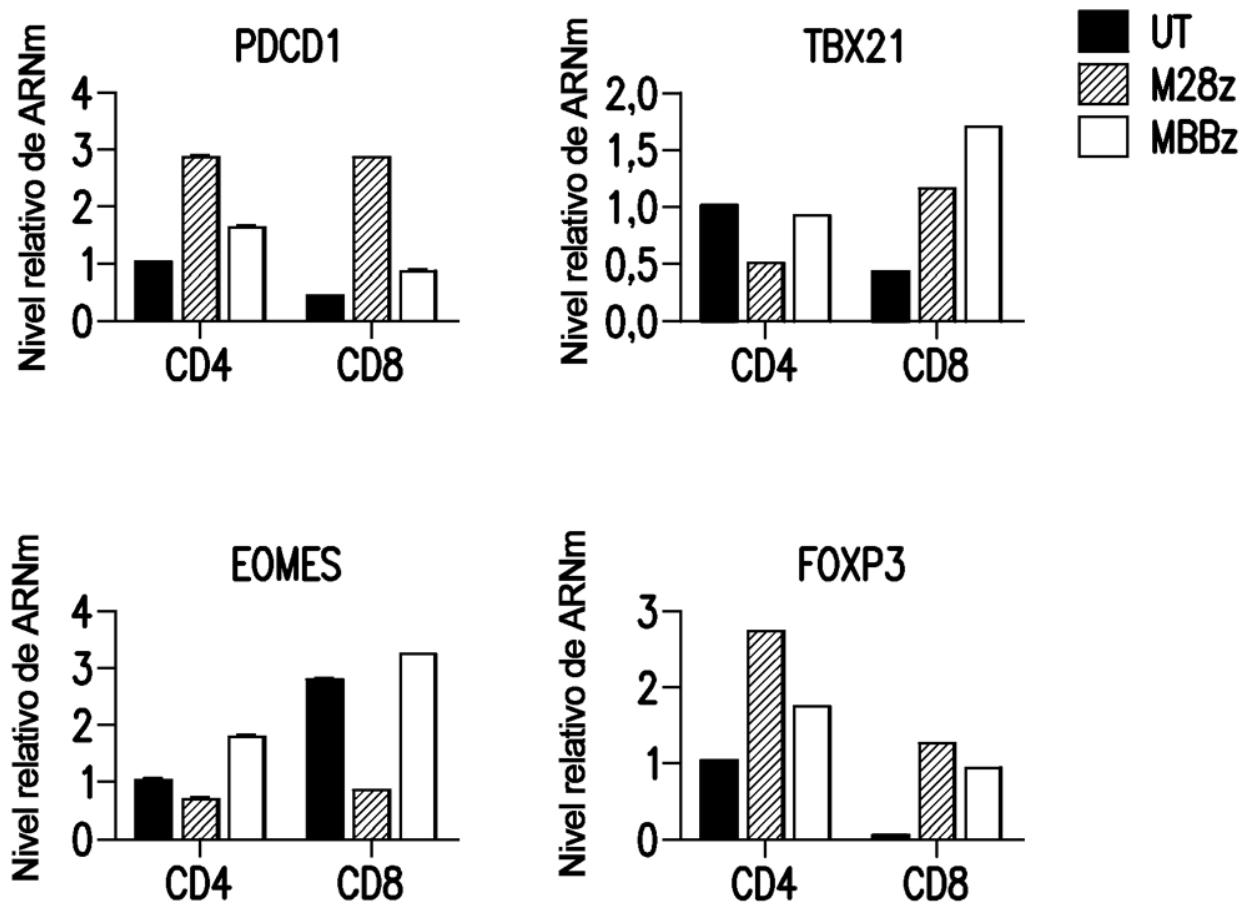


FIG. 55

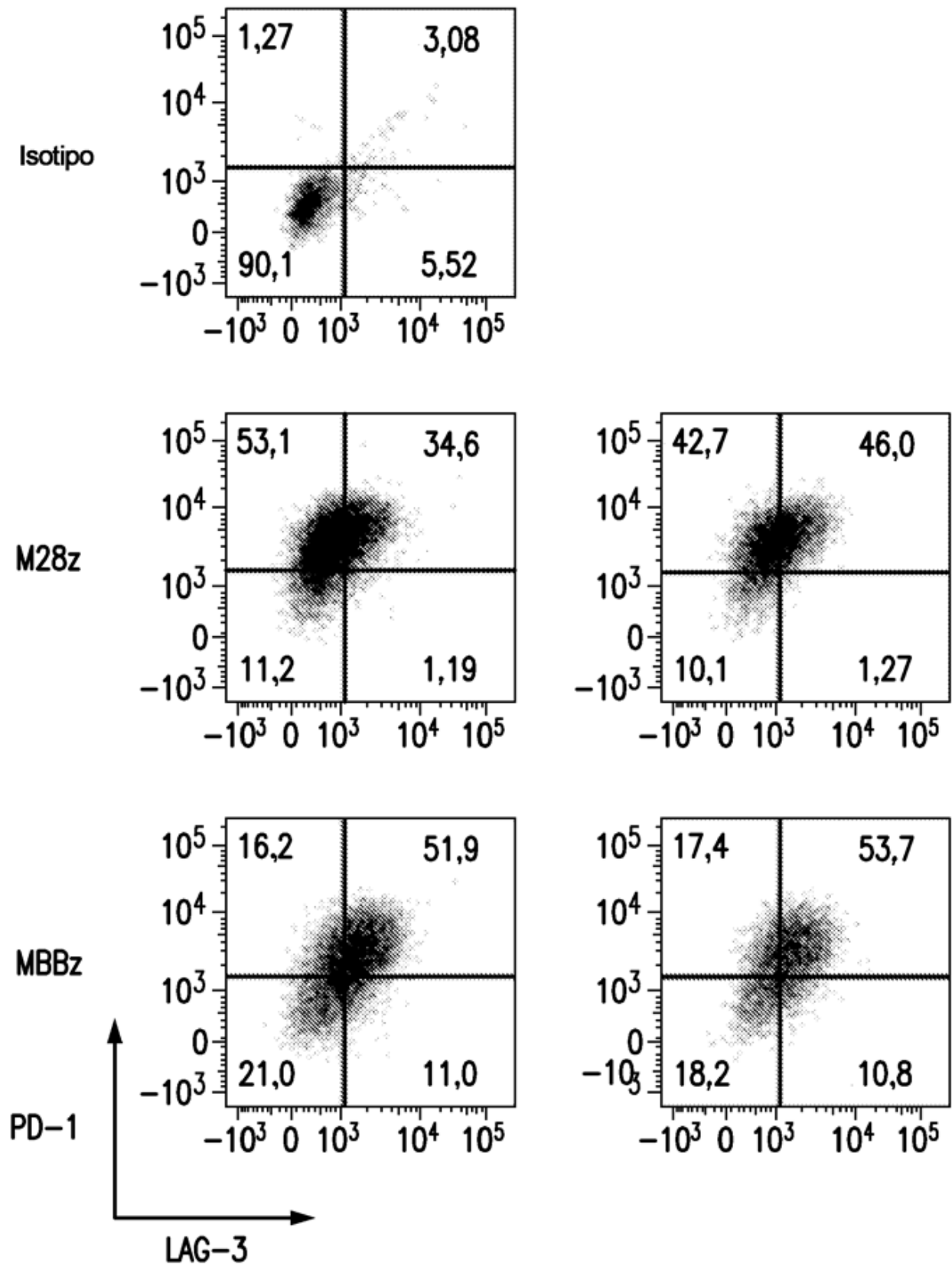


FIG. 56

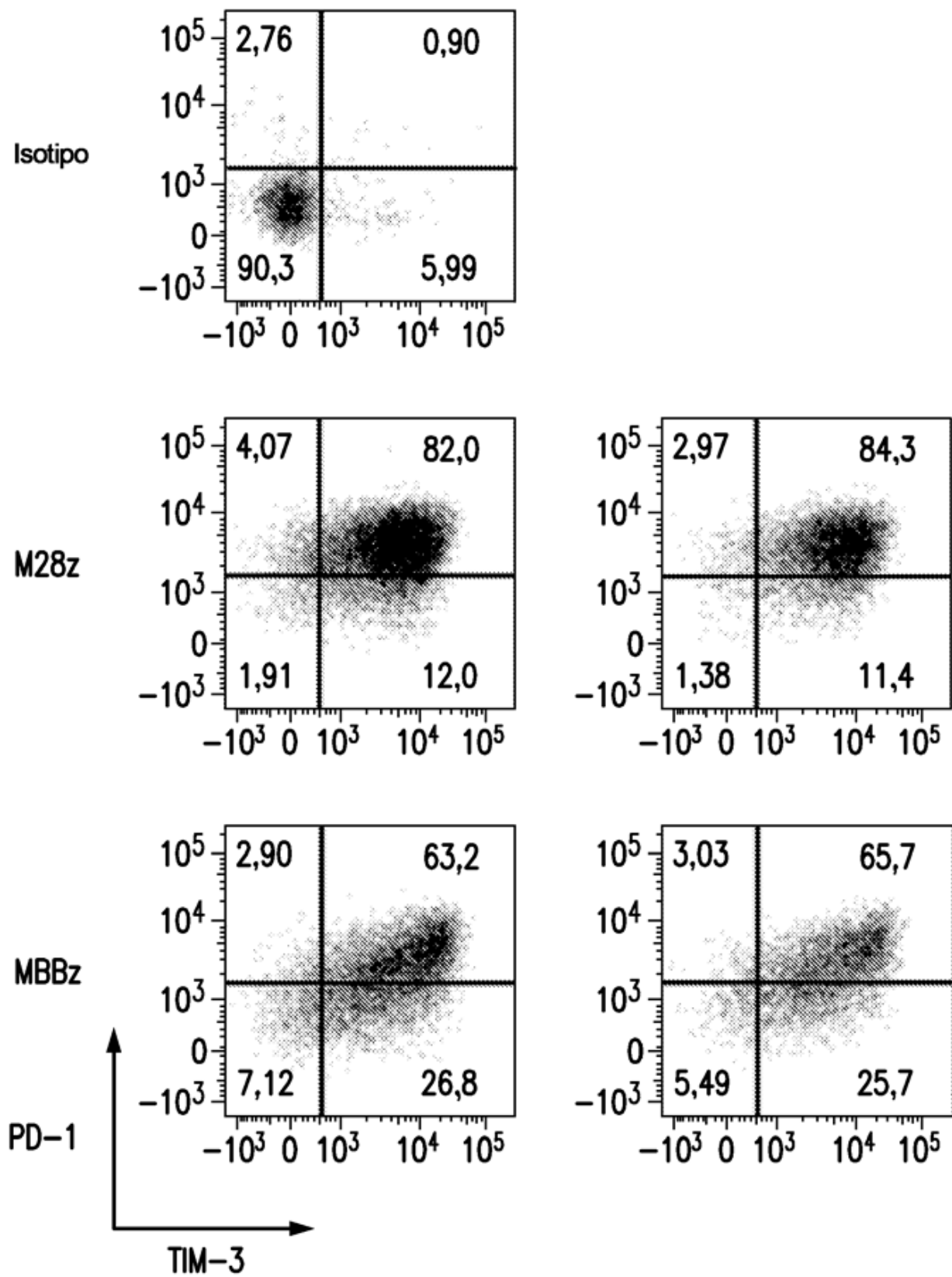
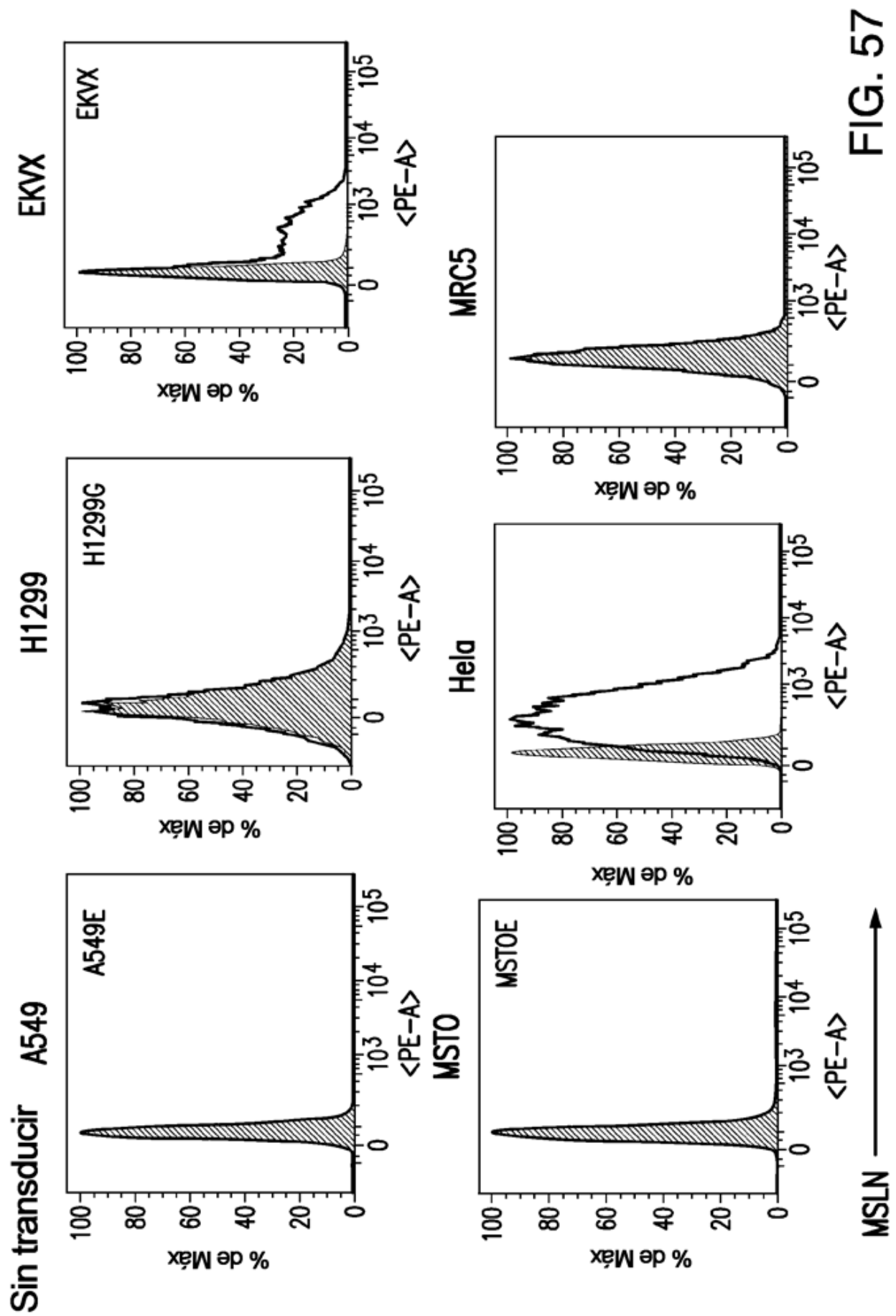


FIG. 56 (continuación)



Transducidas con MSLN

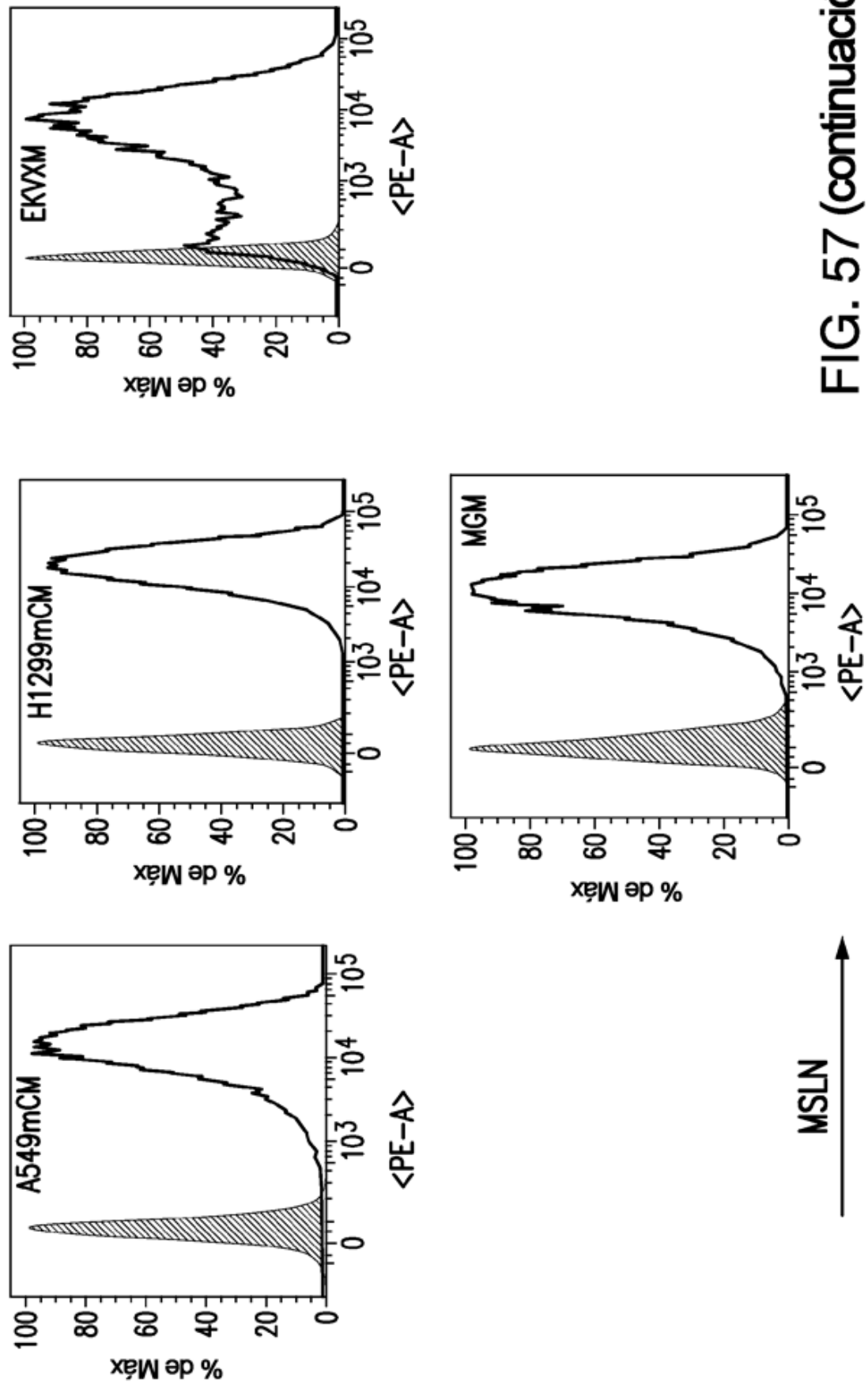


FIG. 57 (continuación)

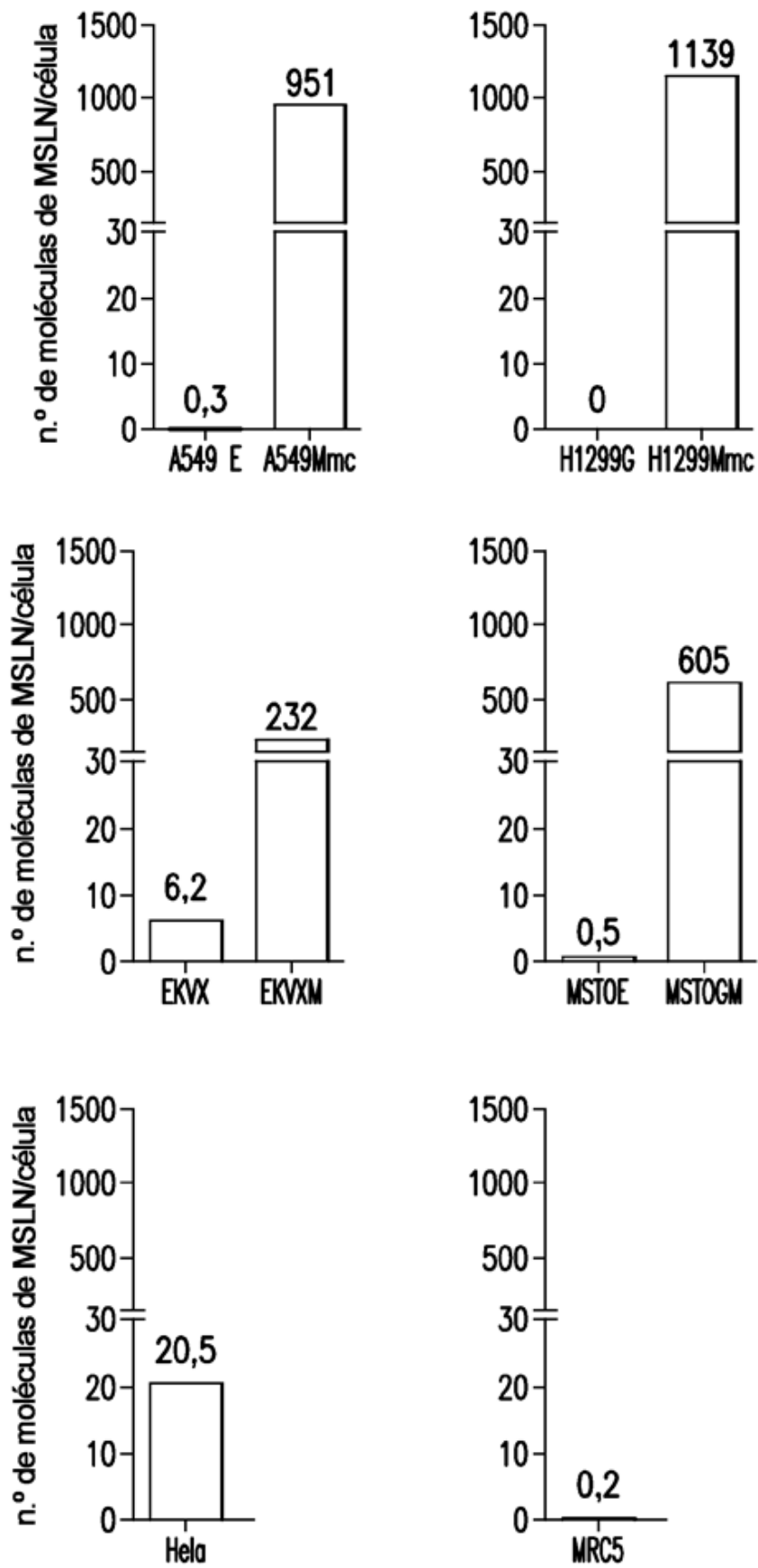


FIG. 58

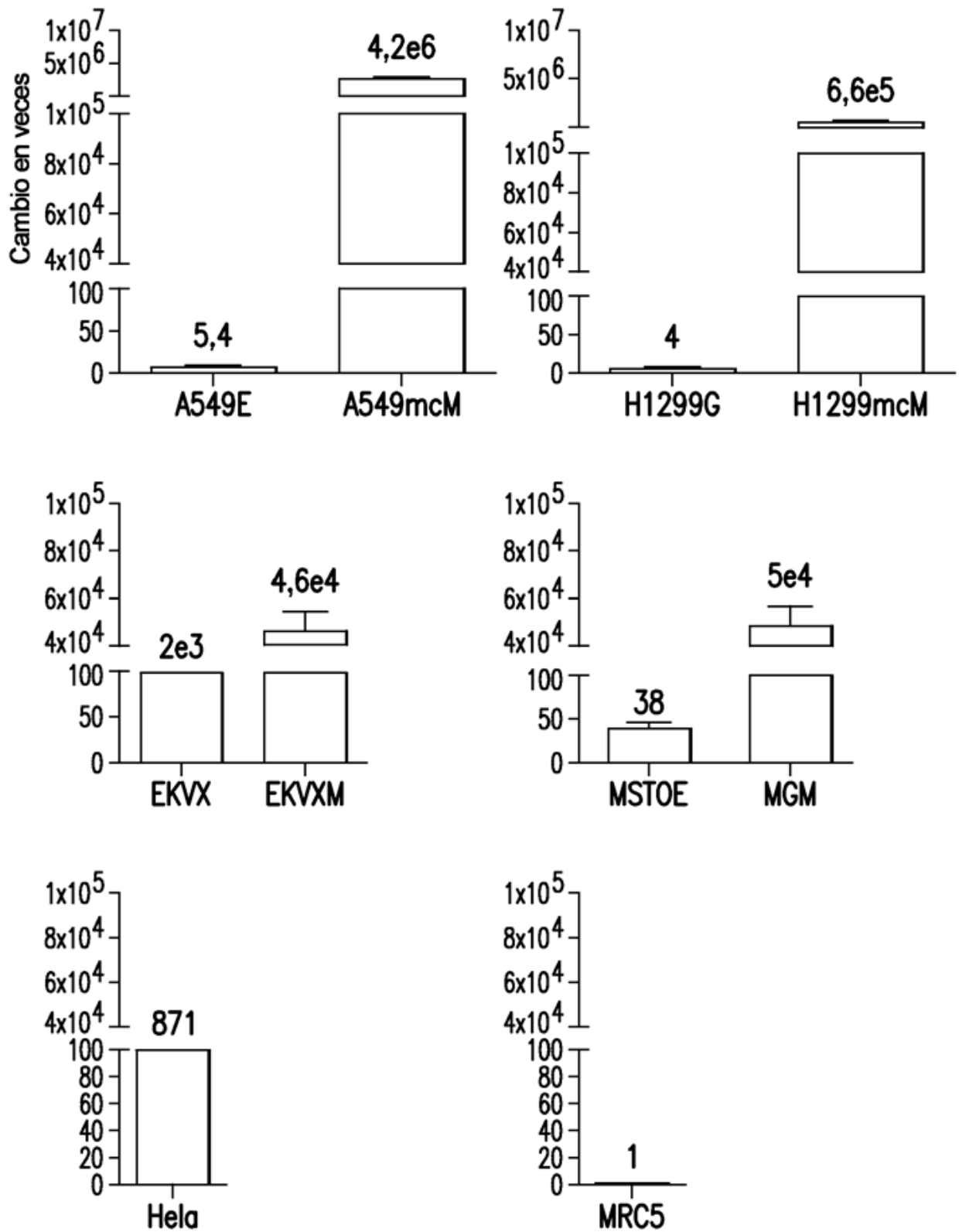
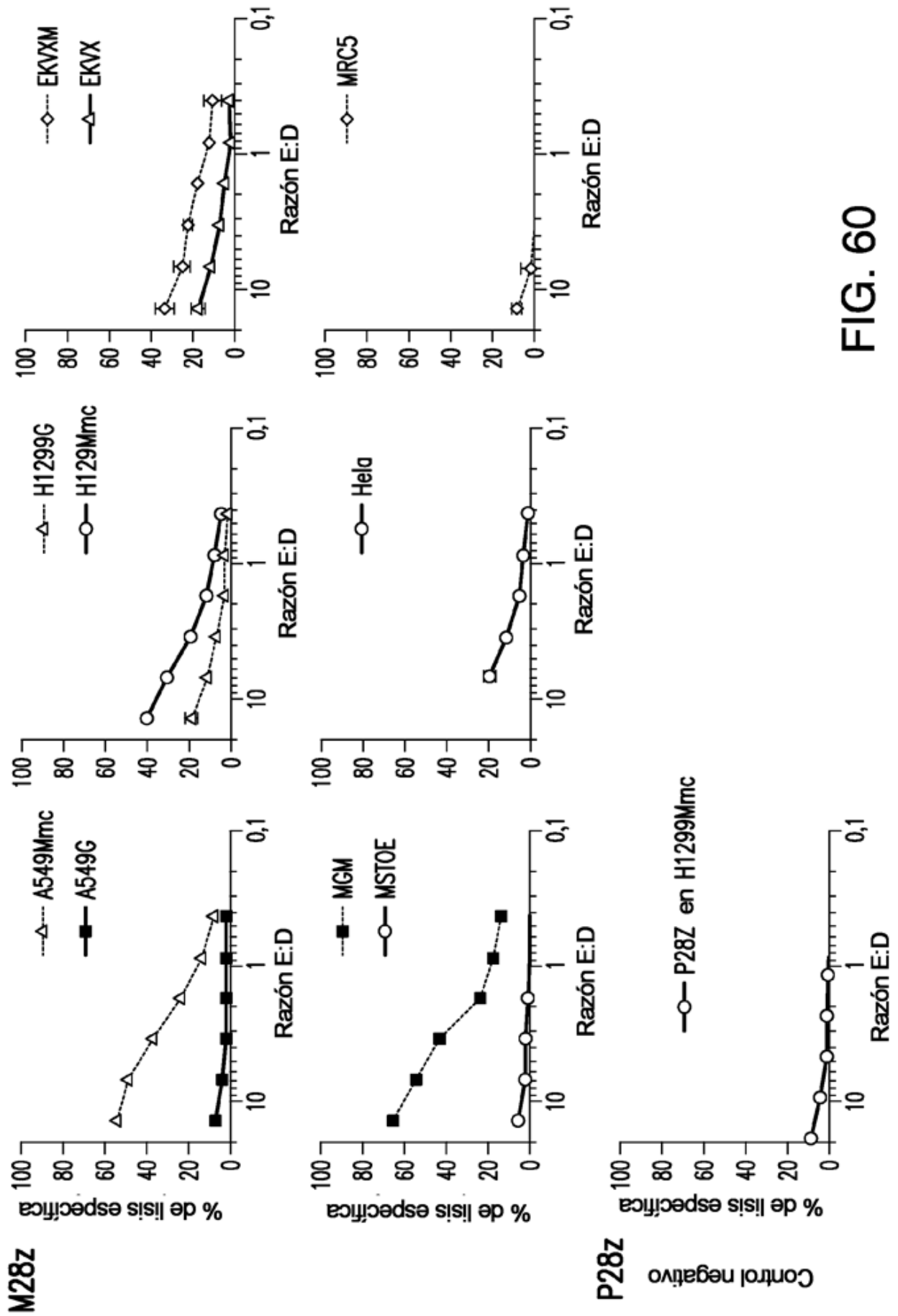


FIG. 59



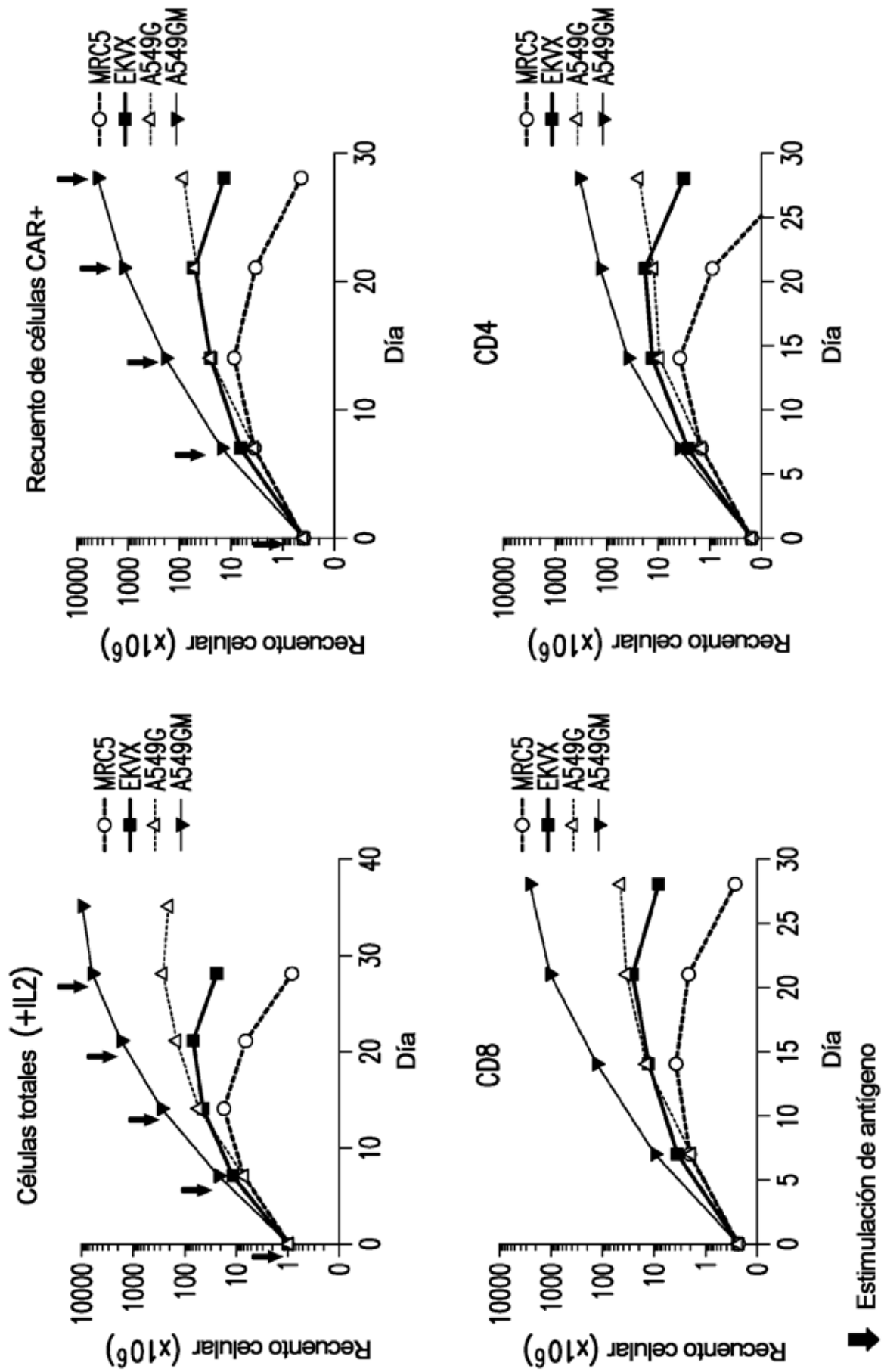


FIG. 61

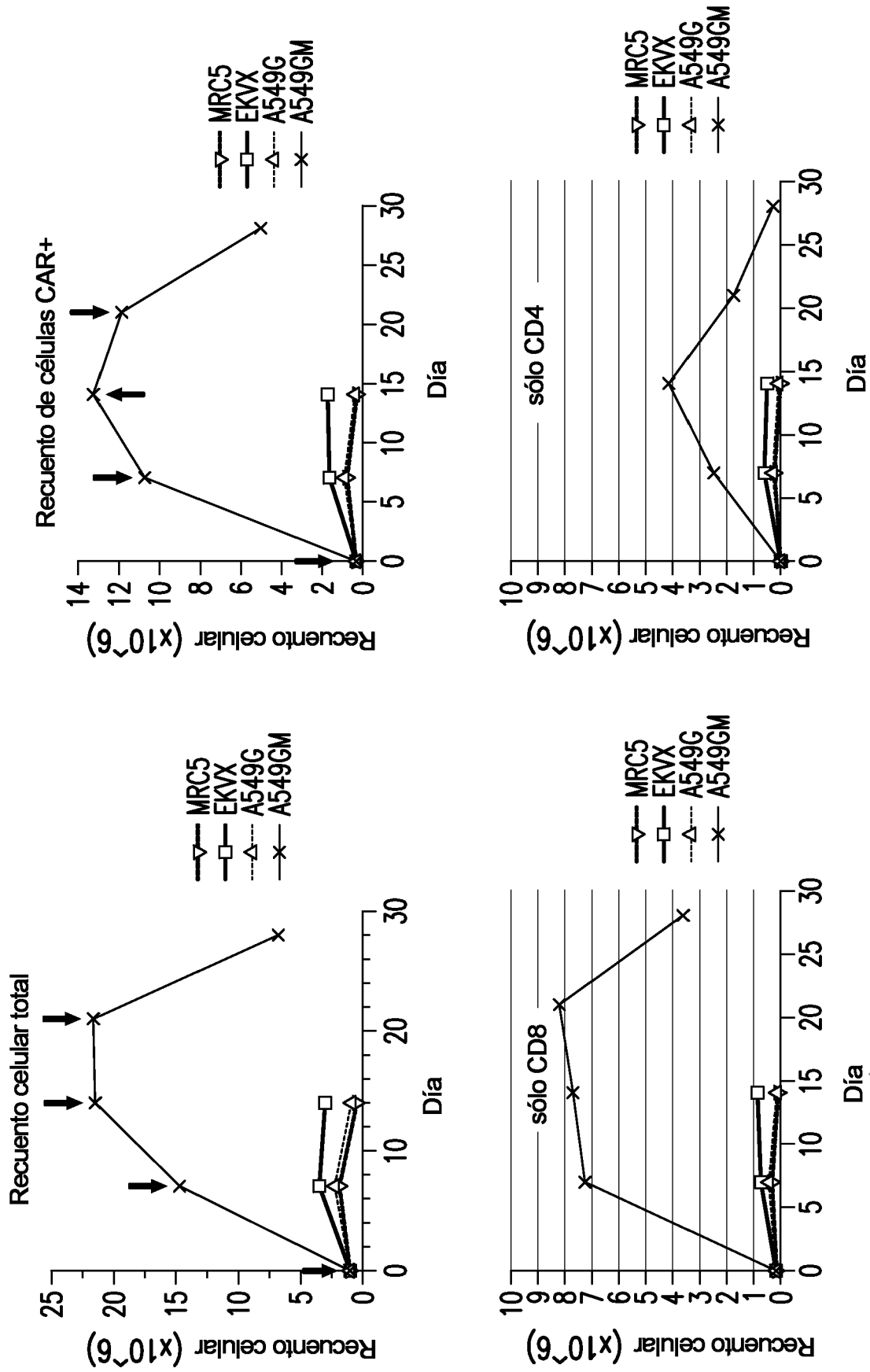


FIG. 62

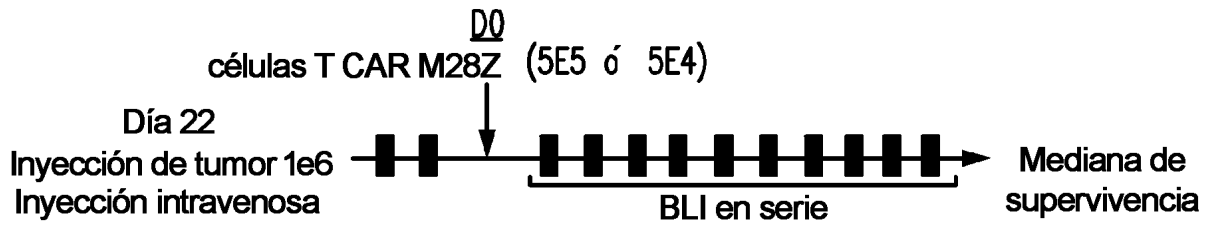


FIG. 63A

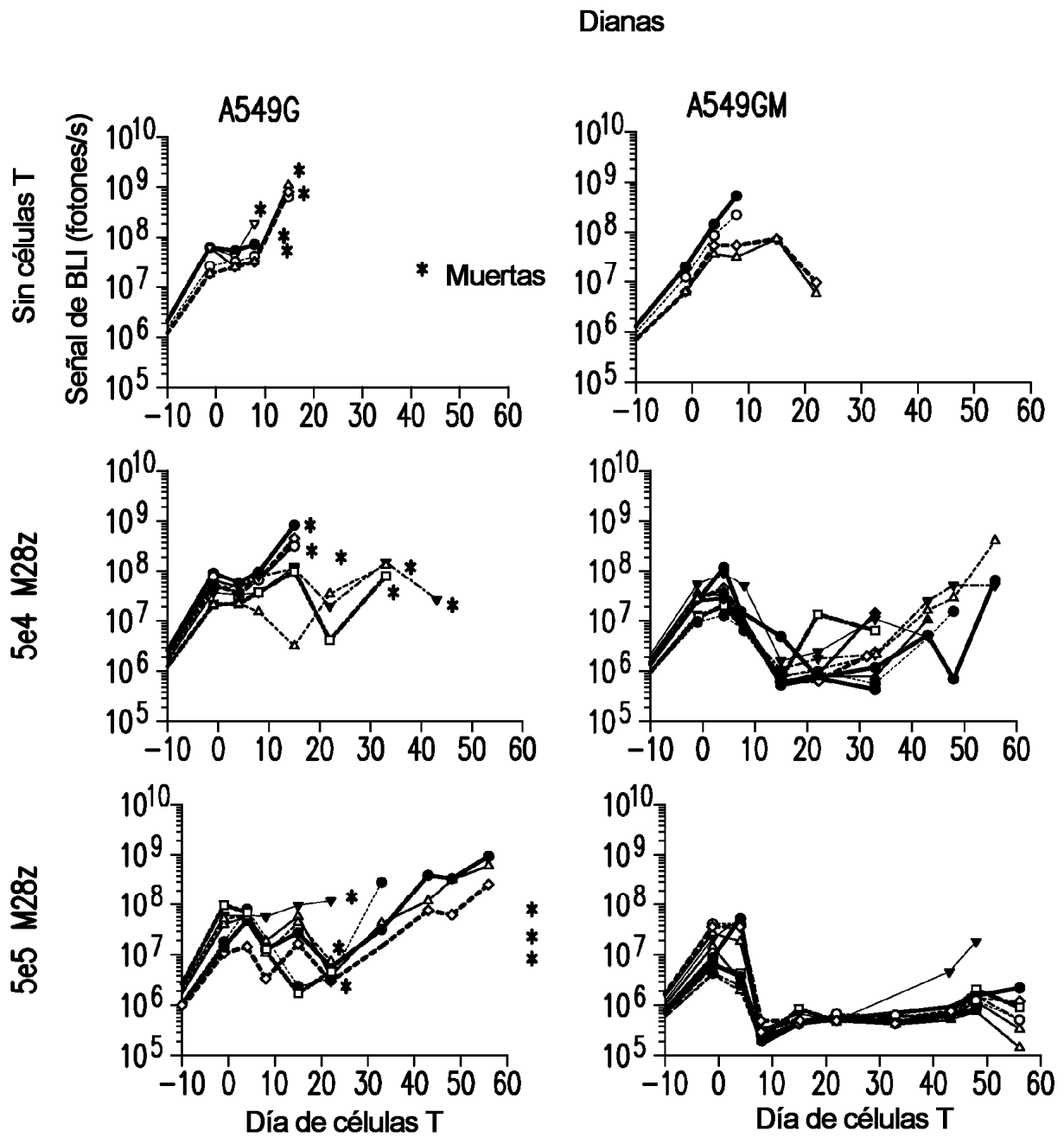


FIG. 63B

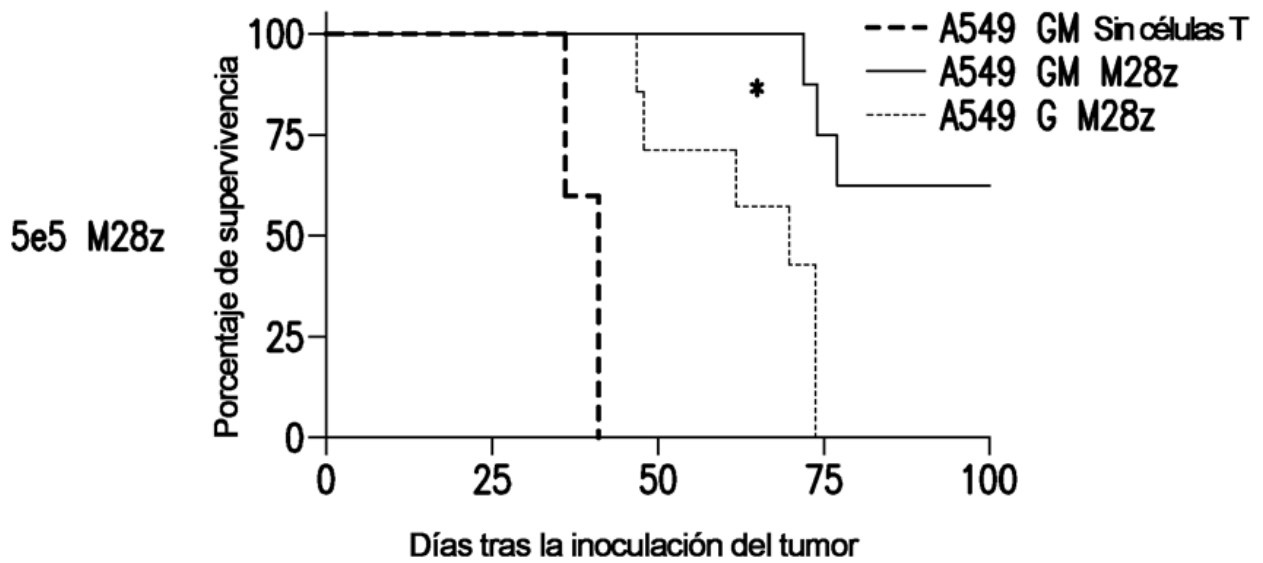
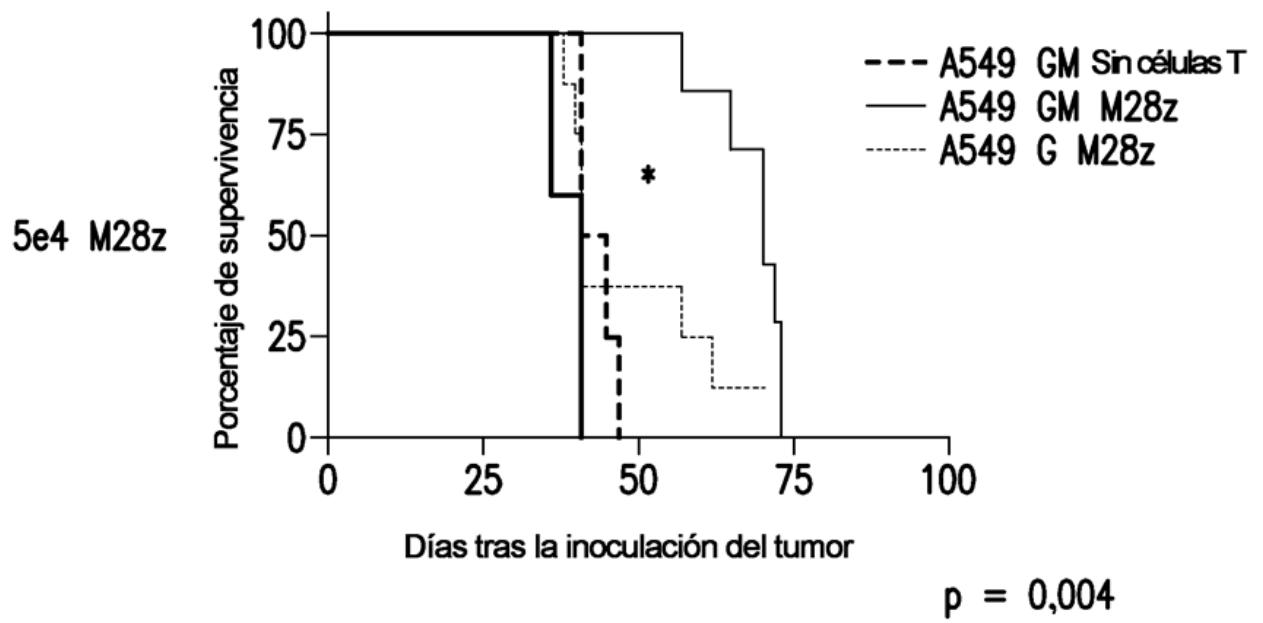
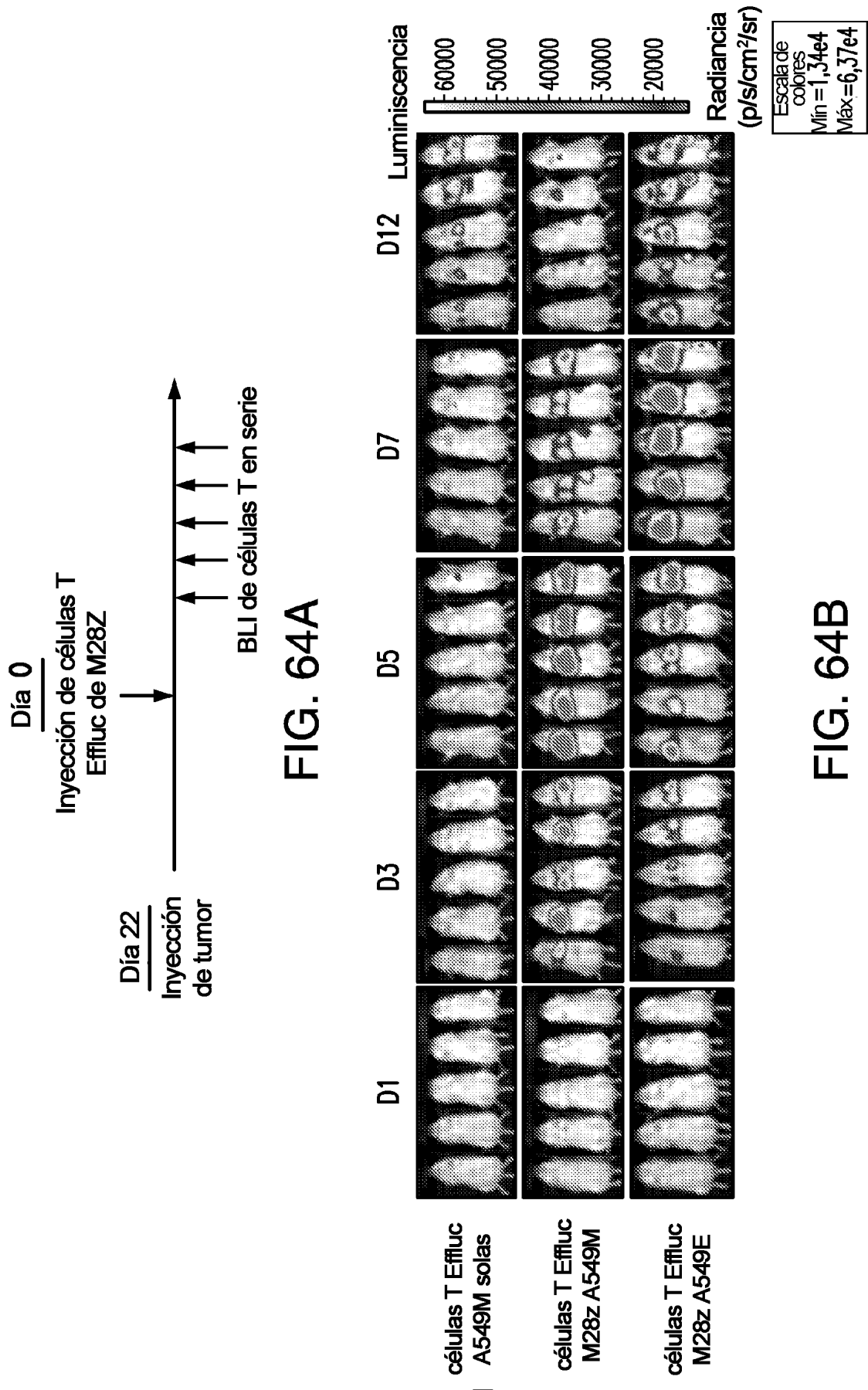


FIG. 63C



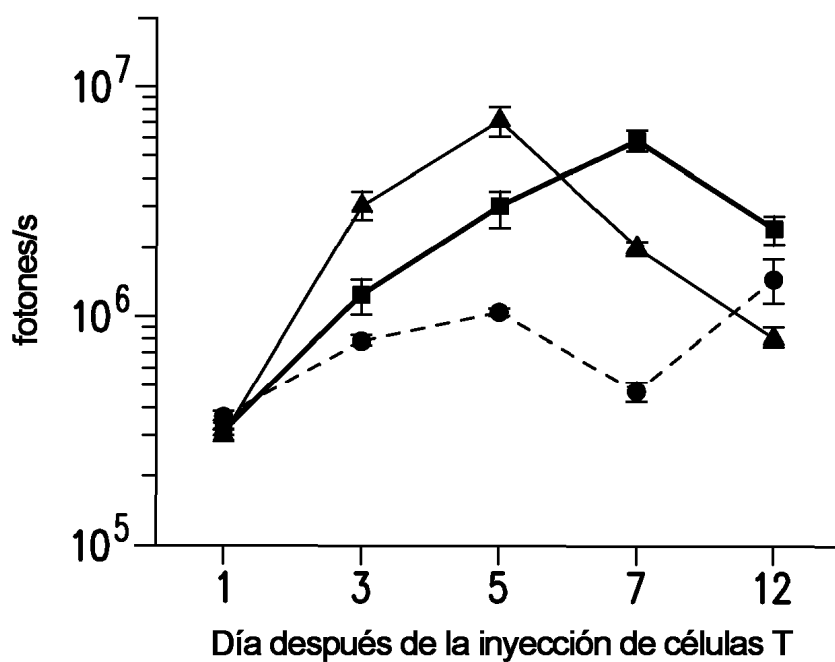


FIG. 64C

Cambio en veces

	Día 1	Día 3	Día 5	Día 7
Effluc A549 M solas	1	$2,19 \pm 0,34$	$2,89 \pm 0,27$	$1,3 \pm 0,27$
Effluc M28z A549 E	1	$3,86 \pm 0,92$	$9,34 \pm 2,5$	$18,30 \pm 4,2$
Effluc M28z A549 M	1	$10,13 \pm 3,6$	$23,37 \pm 6,9$	$6,58 \pm 1$

FIG. 64D