

REIVINDICACIONES

1. Uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican:

a. un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina placentaria/células germinales (ALPG/P), donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

- i. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,
- ii. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,
- iii. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,
- iv. CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,
- v. CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y
- vi. CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6;

b. un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), y donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

- i. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,
- ii. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y
- iii. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16; o
- iv. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,
- v. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y
- vi. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12;

c. una primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y

d. una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518

a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

2. Uno o más ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) de la modalidad 1, donde la primera
5 secuencia de cadena VH del dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.
3. Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de las modalidades 1 o 2, donde la primera secuencia de cadena VL del dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.
- 10 4. Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.
5. Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el segundo dominio VH de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia
15 establecida en la SEQ ID NO: 17.
6. Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la segunda secuencia de cadena VHH de dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.
7. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-6, donde el ácido
20 nucleico recombinante comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 o 166.
8. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39.
- 25 9. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa humana no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.
10. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de al
30 menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos humanos

(TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

11. Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

12. Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

13. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une a fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P) que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

- a. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,
- b. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,
- c. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,
- d. CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,
- e. CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5; y
- f. CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6.

14. Un receptor cebador que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P), un dominio transmembrana que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando; y un dominio intracelular que comprende un efector transcripcional humano o humanizado, donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende

tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

- g. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,
- h. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,
- i. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,
- 5 j. CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,
- k. CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5; y
- l. CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6.

15. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de
10 unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

- a. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,
- b. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y
- c. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

15 16. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de
cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

- 20 a. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,
- b. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y
- c. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

17. Un sistema que comprende un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde

- 25 a. el primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina placentaria/células germinales (ALPG/P), donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una
30 secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

- i. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,
- ii. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,
- iii. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,
- iv. CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,
- v. CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y
- vi. CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6;

b. el segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

- i. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,
- ii. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y
- iii. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16; o
- iv. CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,
- v. CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y
- vi. CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

18. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 12.

19. Una célula inmunitaria que comprende:

a. al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; y/o

b. el anticuerpo o fragmento de antígeno, receptor cebador, CAR o sistema de cualquiera de las reivindicaciones 13-17; y/o

c. el vector de la reivindicación 18.

20. Una célula inmunitaria primaria que comprende al menos un ácido nucleico recombinante que comprende

a. un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a ALPG/P;

b. un receptor de antígeno quimérico que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a MSLN;

c. una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es:

i. complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o

ii. complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41;

donde el ácido nucleico recombinante se inserta en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir el ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria primaria.

21. Una célula inmunitaria primaria que comprende al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir uno o más ácidos nucleicos recombinantes en la célula inmunitaria primaria.

22. Una célula inmunitaria primaria que comprende al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir el ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria primaria.

23. Una célula primaria viable, libre de virus que comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido nucleico recombinante, donde la RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, y donde el ácido nucleico recombinante codifica:

a. un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a ALPG/P;

b. un receptor de antígeno quimérico que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a MSLN;

c. una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es

i. complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o

ii. complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41; y

d. donde los extremos 5' y 3' del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

24. Una célula primaria viable, libre de virus, que comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

25. Una célula primaria viable, libre de virus, que comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

26. Una población de células que comprende una pluralidad de células inmunitarias de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25.

27. Una composición farmacéutica que comprende la célula inmunitaria de cualquiera de

las reivindicaciones 19 a 25 o la población de células de la reivindicación 26, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

28. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el vector de la reivindicación 18, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

29. Un método para editar una célula inmunitaria, que comprende:

a. proporcionar un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido nucleico recombinante, donde la RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde el ácido nucleico recombinante comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y donde los extremos 5' y 3' del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria;

b. introducir de forma no viral el complejo de RNP-ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria, donde el ARN guía se hibrida específicamente con una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde el dominio de nucleasa escinde la región diana para crear el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria; y

c. editar la célula inmunitaria mediante la inserción del ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria.

30. Un método para tratar una enfermedad en un sujeto que comprende administrar la célula inmunitaria de cualquiera de las reivindicaciones 18-26 o la composición farmacéutica de las reivindicaciones 27 o 28 al sujeto.

31. Un método para inducir la expresión de un receptor de antígeno quimérico con un receptor cebador en una célula inmunitaria, que comprende:

a. obtener una célula inmunitaria que comprende

i. el ácido nucleico recombinante de una cualquiera de 1 a 12; y/o

ii. el vector de la reivindicación 18; y

b. poner en contacto la célula inmunitaria con una célula diana que expresa ALPG/P y MSLN, donde la unión del receptor cebador a ALPG/P en la célula diana induce la activación del receptor cebador y la expresión del receptor de antígeno quimérico.

32. Un método para modular la actividad de una célula inmunitaria, que comprende:

- a. obtener una célula inmunitaria que comprende
 - i. el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; y/o
 - ii. el vector de la reivindicación 18; y

5

b. poner en contacto la célula inmunitaria con una célula diana que expresa ALPG/P y MSLN, donde la unión del receptor cebador a ALPG/P en la célula diana induce la activación del receptor cebador y la expresión del receptor de antígeno quimérico y donde la unión del receptor de antígeno quimérico a MSLN en la célula diana modula la actividad de la célula inmunitaria.

10