

CÉLULAS T TRANSFECTADAS Y RECEPTORES DE CÉLULAS T DE UTILIDAD EN INMUNOTERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

ANTECEDENTES

La inmunoterapia en base a células T está dirigida a epitopes peptídicos derivados de proteínas asociadas a tumor o específicas de tumor, que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estos antígenos asociados a tumor (TAA) pueden ser péptidos derivados de todas las clases de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que se expresan y, en comparación con células no alteradas del mismo origen, usualmente están sobreexpresados en células del respectivo tumor.

Los elementos específicos de la respuesta inmunológica celular tienen la capacidad de reconocer y destruir específicamente las células tumorales. El aislamiento de células T de poblaciones de células infiltrantes del tumor o de sangre periférica sugiere que dichas células tienen un papel importante en la defensa inmunológica natural contra el cáncer. Las células T CD8 positivas en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que portan péptidos de usualmente entre 8 y 10 residuos aminoacídicos derivados de proteínas o productos ribosomales defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, cumplen un papel importante en esta respuesta. Las moléculas del MHC humano también son designadas como antígenos leucocitarios humanos (HLA).

El MAGEA4 es un miembro de la familia de genes MAGEA. La expresión de la proteína MAGEA4 y el ARNm se ha vinculado al desarrollo y pronóstico

de diferentes cánceres. El péptido MAG-003, es decir, KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1), es un epítopo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A*0201 de MAGEA4 (aminoácidos 286-294). (Jia y col. 2010; Wu y col. 2011), cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. El MAG-003 genera CTL específicos de péptido *in vitro* a partir de PBMC positivos para HLA-A*0201 y en ratones transgénicos para HLA-A*0201/Kb. Los CTL inducidos por MAG-003 lisan las células blanco de un modo restringido por HLA-A*0201, demostrando que MAG-003 es un epítopo de CTL restringido por HLA-A*0201.

Hay dos clases de moléculas de MHC, la clase I de MHC y la clase II de MHC. Los complejos de péptidos y MHC de clase I son reconocidos por células T CD8 positivas que portan el receptor de célula T (TCR) apropiado, mientras que los complejos de péptidos y moléculas de MHC de clase II son reconocidos por células T colaboradoras CD4 positivas que portan el TCR apropiado. Debido a que ambos tipos de respuestas, dependiente de CD8 y de CD4, contribuyen en conjunto y de manera sinérgica al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de antígenos asociados a tumor y los receptores de células T correspondientes es importante en el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer tales como vacunas y terapias celulares.

En la reacción inmunológica dependiente de MHC de clase I, los péptidos no solo tienen la capacidad de unirse a determinadas moléculas de MHC de clase I expresadas por células tumorales, sino que también tienen que ser reconocidas posteriormente por células T que portan receptores de células T (TCR) específicos. Por lo tanto, los TAA son un punto de partida para el

desarrollo de una terapia en base a células T que incluyen pero no se limita a vacunas tumorales y terapias celulares.

En el caso de hacer blanco en péptido-MHC con TCR específicos (por ejemplo, TCR solubles o TCR de superficie celular) y anticuerpos u otras moléculas de unión (complejos) de acuerdo con la descripción, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En estos casos, la presentación es un factor determinante.

Si bien se han realizado avances en el desarrollo de fármacos de blanco molecular para terapias contra el cáncer, existe una necesidad en el arte por desarrollar nuevos agentes anticancerígenos que estén dirigidos específicamente a moléculas altamente específicas de células cancerosas. La presente memoria descriptiva abarca esa necesidad proveyendo novedosos TCR de MAG-003, ácidos nucleicos, vectores y células huéspedes que se unen específicamente a MAG-003; y métodos para usar dichas moléculas en el tratamiento de cáncer.

RESUMEN

La presente memoria descriptiva se relaciona con receptores de células T (TCR) que comprenden una cadena alfa y/o una cadena beta ("TCR alfa/beta"). En otra forma de realización, la presente memoria descriptiva se relaciona con TCR que comprenden una cadena gamma y/o cadena delta ("TCR gamma/delta").

La presente memoria descriptiva se relaciona además con TCR, subunidades de TCR individuales (solas o combinadas), y subdominios de las mismas, TCR solubles (sTCR), por ejemplo, TCR alfa/beta diméricos solubles

que tienen por lo menos un enlace intercadena disulfuro entre los residuos del dominio constante que no están presentes en los TCR nativos, y TCR clonados, en donde los mencionados TCR se diseñan en células T autólogas o alogeneicas o células progenitoras de células T, y métodos para hacerlos, así como otras células que portan los mencionados TCR.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un TCR que se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA, en donde el péptido MAG-003 se selecciona de KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1) y variantes del mismo, tales como aquellos que se muestran en SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:24. En una forma de realización la molécula de HLA es HLA-A*02.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con TCR que comprenden, un dominio variable de cadena alfa de TCR que tiene por lo menos 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia, preferiblemente 90% de identidad de secuencia, con un dominio variable de cadena alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2; y el dominio variable de cadena beta de TCR tiene por lo menos por lo menos 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia, preferiblemente 90% de identidad de secuencia, con un dominio variable de cadena beta de TCR que se muestra en la Tabla 2.

En una forma de realización, el dominio variable de cadena alfa de TCR tiene por lo menos una mutación en relación a un dominio alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2; y/o el dominio variable de cadena beta de TCR tiene por lo menos una mutación en relación a un dominio alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2. En una forma de realización, un TCR que comprende por lo menos una mutación en el dominio variable de cadena alfa de TCR y/o dominio

variable de cadena beta de TCR tiene una afinidad de unión por, y/o una vida media de unión por, un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA, que es por lo menos el doble que para un TCR que comprende el dominio alfa de TCR no mutado y/o dominio variable beta de TCR no mutado.

Las cadenas alfa de TCR de la presente descripción además pueden comprender un dominio constante de cadena alfa de TCR que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con un dominio constante de cadena alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2. Las cadenas beta de TCR de la presente descripción además pueden comprender un dominio constante de cadena beta de TCR que tiene por lo menos 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a un dominio constante de cadena beta de TCR que se muestra en la Tabla 2.

Las cadenas alfa de TCR de la presente descripción además pueden comprender un dominio transmembrana alfa de TCR y/o un dominio intracelular alfa de TCR. Las cadenas beta de TCR de la presente descripción además pueden comprender un dominio transmembrana beta de TCR y/o un dominio intracelular beta de TCR.

La memoria descriptiva se relaciona además con cadenas alfa de TCR que comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena alfa que se describen en la Tabla 2, y variantes de las mismas que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones en relación a los CDR que se muestran en la Tabla 2. Además se describen cadenas alfa de TCR que comprenden por lo menos una CDR seleccionada de CDR1, CDR2 y CDR3 que se muestran en la Tabla 2. Además se describen cadenas alfa de TCR que comprenden una CDR3 de cadena alfa que se muestra en la Tabla 2.

La memoria descriptiva se relaciona además con cadenas betas de TCR que comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena beta que se describen en la Tabla 2, y variantes de las mismas que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones en relación a las CDR que se muestran en la Tabla 2. Además se describen cadenas betas de TCR que comprenden por lo menos una CDR seleccionada de una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta que se muestran en la Tabla 2. Además se describen cadenas betas de TCR que comprenden una CDR3 de cadena beta que se muestra en la Tabla 2.

La memoria descriptiva se relaciona además con un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica para un TCR de la presente descripción. En una forma de realización, los ácidos nucleicos de la memoria descriptiva codifican para una cadena alfa de TCR y/o una cadena beta de TCR como se muestra en la Tabla 2.

La memoria descriptiva se relaciona además con un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica para una cadena alfa de TCR, cadena beta, o ambas, como se describe en la presente.

La memoria descriptiva se relaciona además con una célula huésped aislada que comprende un vector de expresión recombinante que expresa un ácido nucleico que codifica para la cadena alfa de TCR, cadena beta, o ambas, como se describe en la presente.

La memoria descriptiva se relaciona además con una célula huésped aislada que comprende un vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente memoria descriptiva, preferiblemente en donde la célula es una célula

humana, preferiblemente un linfocito de sangre periférica (PBL), más preferiblemente un linfocito T CD4 o CD8 positivo.

La memoria descriptiva se relaciona además con un PBL aislado que comprende el vector de expresión recombinante de la memoria descriptiva, en donde el PBL es una célula T CD8+ o una célula T CD4+.

La memoria descriptiva se relaciona además con una población de células que comprenden por lo menos una célula huésped descrita en la presente.

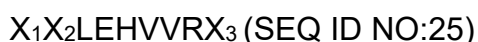
La memoria descriptiva se relaciona además con TCR y células huéspedes de la presente descripción para usar en el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como, cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico.

En un aspecto, la célula huésped es una célula T CD8+ o una célula T CD4+ transfectada con un ácido nucleico que codifica para por lo menos un TCR de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde el TCR comprende por lo menos una secuencia de aminoácidos descrita en la Tabla 2. En otro aspecto dichas células huéspedes se usan en la inmunoterapia de cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de

Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico, y preferiblemente cáncer de pulmón a células no pequeñas.

La memoria descriptiva se relaciona además con métodos para matar o para reducir el número de células cancerosas que comprenden poner en contacto las células cancerosas con un TCR, ácido nucleico, vector o célula huésped como se describe en la presente. También se proveen métodos para tratar el cáncer que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite un TCR, ácido nucleico, vector o célula huésped como se describe en la presente.

En otro aspecto, la presente memoria descriptiva se relaciona con un péptido MAG-003, por ejemplo un péptido aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la siguiente fórmula general I:



Fórmula I

en donde X_1 se selecciona de los aminoácidos K e Y, X_2 se selecciona de los aminoácidos V, L y A, y X_3 se selecciona de V, L, A, y I, en donde el mencionado péptido se une a una molécula de HLA de clase I o de clase II y/o induce la reacción cruzada de células T con el mencionado péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto, el mencionado péptido no es el polipéptido de longitud completa subyacente.

Se prefiere una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 o una secuencia variante de la misma que es por lo menos 66%, preferiblemente por lo menos 77%, y más preferiblemente por lo menos 88% homóloga (preferiblemente por lo menos 77% o por lo menos 88% idéntica) a la SEQ ID NO:1, en donde la mencionada variante se une a una molécula de HLA

de clase I o de clase II y/o induce la reacción cruzada de las células T con el mencionado péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el mencionado péptido no es el polipéptido de longitud completa subyacente.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un péptido de la presente descripción que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 o una variante de la misma, que es por lo menos 66%, preferiblemente por lo menos 77%, y más preferiblemente por lo menos 88% homóloga (preferiblemente por lo menos 77% o por lo menos 88% idéntica) a la SEQ ID NO:1, en donde el mencionado péptido o variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

Las siguientes tablas muestran péptidos ejemplificativos de acuerdo con la presente memoria descriptiva, y sus respectivos NOs de SEQ ID. En un aspecto, los péptidos de la Tabla 1 pueden unirse a HLA-A*02. En otro aspecto, los TCR descritos en la presente tienen la capacidad de unirse o unirse específicamente a uno o más péptidos de la Tabla 1.

Tabla 1: Péptidos de acuerdo con la presente memoria descriptiva

SEQ ID NO:	Secuencia
1	KVLEHVVRV
2	KVLEHVRL
3	KVLEHVRA
4	KVLEHVRI
5	KLLEHVVRV
6	KLLEHVRL

SEQ ID NO:	Secuencia
7	KLLEHVVR
8	KLLEHVRI
9	KALEHVVR
10	KALEHVRL
11	KALEHVRA
12	KALEHVRI
13	YLLEHVVR
14	YLLEHVRL
15	YLLEHVRA
16	YLLEHVRI
17	YALEHVVR
18	YALEHVRL
19	YALEHVRA
20	YALEHVRI
21	YVLEHVVR
22	YVLEHVRL
23	YVLEHVRA
24	YVLEHVRI

En un aspecto, la presente memoria descriptiva se relaciona con el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer

de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico por utilización de uno o más péptidos descritos en la presente.

Particularmente se prefieren péptidos — solos o combinados — de acuerdo con la presente memoria descriptiva seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24. Se prefieren más los péptidos — solos o combinados —seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24 (véase Tabla 1), y sus usos en la inmunoterapia de cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico, y preferiblemente cáncer de pulmón a células no pequeñas.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva se relaciona con péptidos de acuerdo con la presente memoria descriptiva que tienen la capacidad de unirse a una molécula de HLA de clase I o — en una forma más larga, tal como una variante de longitud —HLA de clase II.

En un aspecto, la presente memoria descriptiva se relaciona con los péptidos de acuerdo con la presente memoria descriptiva en donde los mencionados péptidos (cada uno) comprende, consiste en, o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con los péptidos de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde el mencionado péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con los péptidos de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde el mencionado péptido es parte de una proteína de fusión, en particular fusionada a los aminoácidos del extremo N terminal de la cadena invariante asociada a antígeno de HLA-DR (Ii), preferiblemente los 80 aminoácidos del extremo N terminal del mismo, o fusionado a (o en la secuencia de) un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico por células dendríticas.

La memoria descriptiva se relaciona además con un ácido nucleico que codifica para los péptidos de acuerdo con la memoria descriptiva. La memoria descriptiva se relaciona además con el ácido nucleico de acuerdo con la memoria descriptiva que es ADN, ADNc, ANP, ARN o combinaciones de los mismos.

La memoria descriptiva se relaciona además con un vector de expresión con capacidad de expresar y/o que expresa un ácido nucleico de acuerdo con la memoria descriptiva.

La memoria descriptiva se relaciona además con un péptido de acuerdo con la memoria descriptiva, un ácido nucleico de acuerdo con la memoria descriptiva o un vector de expresión de acuerdo con la memoria descriptiva para usar en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular en el tratamiento de cáncer.

La memoria descriptiva se relaciona además con anticuerpos que se unen específicamente a los péptidos de acuerdo con la presente memoria

descriptiva o complejos de los mencionados péptidos de acuerdo con la memoria descriptiva con MHC, y métodos para fabricar dichos anticuerpos.

La memoria descriptiva se relaciona además con una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la memoria descriptiva o un vector de expresión como se describió precedentemente.

La memoria descriptiva se relaciona además con la célula huésped de acuerdo con la memoria descriptiva que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente es una célula dendrítica.

La memoria descriptiva se relaciona además con un método para producir un péptido de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde el método comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la memoria descriptiva, y aislar el péptido de dicha célula huésped o de su medio de cultivo.

La memoria descriptiva se relaciona además con métodos de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde el antígeno se carga sobre moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o célula presentadora de antígeno artificial al poner en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno o el antígeno se carga sobre tetrámeros de MHC de clase I o II por tetramerización del antígeno/monómeros de complejo MHC de clase I o II.

La memoria descriptiva se relaciona además con el método de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión con capacidad de expresar o que expresa el mencionado péptido que contiene la SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24, preferiblemente que contiene la SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24, o una secuencia variante de aminoácidos del mismo.

La memoria descriptiva se relaciona además con linfocitos T activados, producidos por el método de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde una célula T reconoce selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la memoria descriptiva.

La memoria descriptiva se relaciona además con métodos para matar el cáncer y/o suprimir células en un paciente en donde las células cancerosas expresan en forma aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde los métodos comprenden administrar al paciente un número eficaz de células T producidas de acuerdo con la memoria descriptiva.

La memoria descriptiva se relaciona además con el uso de cualquier péptido descrito en la presente, ácidos nucleicos de acuerdo a lo descrito en la presente, vectores de expresión descritos en la presente, células descritas en la presente, linfocitos T activados descritos en la presente, receptores de células T, anticuerpos, u otras moléculas de unión a péptido y/o péptido-MHC de acuerdo con la presente memoria descriptiva como un medicamento o en la fabricación de un medicamento. En un aspecto, el medicamento es activo contra el cáncer.

Preferiblemente, el mencionado medicamento es una terapia celular, una vacuna o una proteína en base a un TCR, un TCR soluble o anticuerpo.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un uso de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde las células cancerosas son cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico,

cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico, y preferiblemente cáncer de pulmón a células no pequeñas.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con biomarcadores en base a los péptidos de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en la presente llamados “blancos”, que pueden usarse en el diagnóstico de cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón a células no pequeñas. El marcador puede ser la sobreexpresión de uno o más péptidos en sí mismos, o la sobreexpresión de uno o más genes correspondientes. Los marcadores también pueden usarse para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferiblemente una inmunoterapia, y más preferiblemente una inmunoterapia dirigida al mismo blanco que es identificado por el biomarcador. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo o TCR soluble para teñir secciones de un tumor para detectar la presencia de un péptido de interés en complejo con MHC. Opcionalmente el anticuerpo o TCR soluble porta una función efectora adicional tal como un dominio estimulante del sistema inmunológico o toxina.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con el uso de novedosos blancos para la identificación de TCR que reconocen por lo menos uno de los mencionados blancos, y preferiblemente la identificación de los mencionados TCR que activan las células T.

La presente memoria descriptiva también se relaciona con el uso de blancos novedosos en el contexto del tratamiento contra el cáncer.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

En la Figura 1 se muestra la presentación del péptido MAG-003 en tejidos sanos y cánceres.

En las Figuras 2-4 se muestra la expresión de MAG-003 en tejidos cancerosos y sanos.

En las Figuras 5-7 se muestra la liberación de IFN γ de células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta de los TCR R7P1D5, R20P1H7 y R10P2G12 (Tabla 2), respectivamente, después de la coincubación con células blanco cargadas con el péptido MAG-003 (SEQ ID NO:1) o péptido homólogo pero no relacionado RABGAP1L-001 (SEQ ID NO:91), AXIN1-001 (SEQ ID NO:92), ANO5-001 (SEQ ID NO:93), TPX2-001 (SEQ ID NO:94), SYNE3-001 (SEQ ID NO:95), MIA3-001 (SEQ ID NO:96), HERC4-001 (SEQ ID NO:97), PSME2-001 (SEQ ID NO:98), HEATR5A-001 (SEQ ID NO:99) o CNOT1-003 (SEQ ID NO:100) o péptido control NYESO1-001 (SEQ ID NO:101). Los datos de liberación de IFN γ se obtuvieron con células T CD8 $^{+}$ derivadas de dos donantes diferentes (donante 1 en el eje X derecho, donante 2 en el eje C izquierdo). Las células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células blanco no cargadas sirvieron como control.

En la Figura 8 se muestra la tinción del tetrámero de MHC/MAG-003 o el tetrámero de MHC/NYESO1-001 de las células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta de los TCR R7P1D5, R20P1H7 and R10P2G12 (Tabla 2), respectivamente. Las células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN del TCR 1G4 que se une específicamente al complejo MHC/NYESO1-001 y células T CD8 $^{+}$ con control de electroporación sirvieron como control.

En las Figuras 9-11 se muestra la liberación de IFN γ de las células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta de los TCR R7P1D5, R20P1H7 y R10P2G12 (Tabla 2), respectivamente, después de la coincubación con células blanco cargadas con el péptido MAG-003 (SEQ ID NO:1) o diferentes variantes de MAG-003 con sustitución de alanina en las posiciones 1-9 de SEQ ID NO:1. Las células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN solas o coincubadas con células blanco cargadas con el péptido control NYESO1-001 o células blanco no cargadas sirvieron como control. Los datos de liberación de IFN γ se obtuvieron con células T CD8 $^{+}$ derivadas de dos donantes diferentes (donante 1 en el eje X derecho, donante 2 en el eje X izquierdo).

En la Figura 12 se muestra la liberación de IFN γ de células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta de los TCR (A) R7P1D5, (B) R20P1H7, y (C) R10P2G12 después de la coincubación con la línea celular de melanoma A-375, línea celular de glioblastoma T98G y línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, respectivamente. Las células T CD8 $^{+}$ electroporadas con ARN solas sirvieron como control.

En la Figura 13 se cocultivaron células T transfectadas con ARN que codifica para el TCR R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7, de simulación o el TCR control 1G4 (SEQ ID NO:X) con diferentes células de tejidos sanos humanos primarios (véase Tabla 13 para las abreviaturas), la línea de células tumorales negativas blanco MCF-7 y las líneas celulares positivas para MAGEA4 y NY-ESO1, A-375 y NCI-H1755. La expresión de los TCR R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7 y 1G4 en células T se logró por electroporación usando un vector de ARN. Los cultivos de células de tejidos sanos humanos no llevaron a un reconocimiento mediado por TCR significativo y la activación de células T para

los TCR R7P1D5, R10P2G12 o R20P1H7. Relación E:T 1:1, 20.000 células en cada uno, promedio de la liberación de IFN- γ después de 20 h de los duplicados se muestra según lo medido por ELISA. Las barras de error indican las desviaciones estándares. Los resultados se normalizaron por sustracción de la liberación de IFN- γ de las células T transfectadas con TCR solamente y la liberación de IFN- γ debido al cocultivo de células blanco y células T que no expresan el TCR de interés.

Figura 14. Datos acumulados de 4 donantes estudiados para la expresión del transgén de TCR R7P1D5 después de la transducción con 6 construcciones lentivirales diferentes (R71-R78). Las células T CD3⁺/CD8⁺ se analizaron por citometría de flujo para estudiar la proporción de células de unión al tetrámero MHC/MAG-003 a las 96 horas posteriores a la transducción. Las células T no transducidas (NT) teñidas para MHC/MAG-003 y las células T transducidas con el TCR 1G4 (NY-ESO1) teñidas para el tetrámero MHC/NYESO1-001 se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. Las células se limitaron a la población de CD3⁺CD8⁺ vivas.

Fig. 15 A. Respuesta efectora de células T transducidas con TCR R7P1D5 medida por medio de la producción de IFN γ en el cocultivo de la línea celular tumoral que expresa MAGEA4 A375 y la línea de células tumorales negativas para MAGEA4 MCF-7. Las células T transducidas con el sobrenadante concentrado de lentivirus R73 que codifica para el TCR R7P1D5 se compararon con células no transducidas (NT) derivadas de PBMC de 4 donantes sanos. Los resultados se presentan como promedio $\pm$ SEM de triplicados. B. Respuestas de IFN γ de células T transducidas con TCR R7P1D5 (lentivirus R73) de PBMC de 2 donantes sanos (donantes 6 y 7) con el

cocultivo con células blanco T2 pulsadas con concentraciones decrecientes del péptido MAG-003. Los resultados se presentan como promedio $\pm$ SEM de triplicados medidos 96 horas después de la transducción.

Figura 16 (A, B). Respuesta citotóxica de células T transducidas con TCR R7P1D5 (lentivirus R73) y no transducidas (NT) medida contra la línea celular tumoral que A375 que expresan MAGEA4 en diferentes relaciones E:T en un ensayo de 4h de liberación de Cr51. Los resultados se presentan como promedio $\pm$ SEM de 3-4 duplicados. (C) Datos combinados de 7 productos de células T transducidas con TCR R7P1D5 (lentivirus R73) generadas a partir de 5 donantes que muestran muerte específica por antígeno de blancos tumorales que expresan MAGEA4 (A375) y negativos para MAGEA4 (MCF-7) con una relación E:T de 40:1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente memoria descriptiva se relaciona con receptores de células T (TCR) que comprenden una cadena alfa y/o una cadena beta ("TCR alfa/beta"). También se proveen péptidos MAG-003 con capacidad de unirse a TCR y anticuerpos cuando son presentados por una molécula de MHC. La presente memoria descriptiva también se relaciona con ácidos nucleicos, vectores y células huéspedes para expresar TCR y péptidos de la presente descripción; y métodos para usarlos.

El objetivo de la invención por lo tanto se resuelve en un primer aspecto por una construcción de reconocimiento de antígeno que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) 3 que tiene por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferiblemente 100%

de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las SEQ ID NOs. 44, 52, 60, 68, 76, y 84.

La construcción de reconocimiento de antígeno de acuerdo con la invención preferiblemente se selecciona de un anticuerpo, o derivado o fragmento del mismo, o un receptor de células T (TCR), o derivado o fragmento del mismo. Un derivado o fragmento de un anticuerpo o TCR de la invención preferiblemente debe retener la capacidad de unirse/reconocer a un antígeno de la molécula parental, en particular su especificidad y/o selectividad como se explicó precedentemente. Dicha funcionalidad de unión puede ser retenida por la presencia de una región CDR3 como se define en la presente.

En una forma de realización de la invención, los TCR de la invención tienen la capacidad de reconocer los antígenos TAA de una manera dependiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. "De una manera dependiente del MHC de clase I", como se usa en la presente, se refiere a que el TCR provoca una respuesta inmunológica al unirse a antígenos TAA en el contexto de una molécula de MHC de clase I. La molécula de MHC de clase I puede ser cualquier molécula de MHC de clase I conocida en el arte, por ejemplo, moléculas de HLA-A. En una forma de realización preferida de la invención, la molécula de MHC de clase I es una molécula HLA-A*02.

La invención provee una construcción de reconocimiento de antígeno de cadena simple y construcciones de reconocimiento de cadena doble.

En una forma de realización, el dominio variable de cadena alfa de TCR tiene por lo menos una mutación en relación a un dominio alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2; y/o el dominio variable de cadena beta de TCR tiene por lo menos una mutación en relación a un dominio alfa de TCR que se muestra

en la Tabla 2. En una forma de realización, un TCR que comprende por lo menos una mutación en el dominio variable de cadena alfa de TCR y/o dominio variable de cadena beta de TCR tiene una afinidad de unión por, y/o una vida media de unión por, un complejo péptido TAA-molécula HLA, que es por lo menos el doble que de un TCR que comprende el dominio alfa de TCR no mutado y/o dominio variable beta de TCR no mutado.

Las cadenas alfa de TCR de la presente descripción además pueden comprender un dominio transmembrana de TCR alfa y/o un dominio intracelular de TCR alfa. Las cadenas beta de TCR de la presente descripción además pueden comprender un dominio transmembrana beta de TCR y/o un dominio intracelular beta de TCR.

La invención en particular provee un TCR como construcción de reconocimiento antigénico, o fragmento o derivado del mismo. El TCR preferiblemente es de humano, que se entiende como que es generado a partir de un *locus* de TCR humano y por lo tanto comprende las secuencias de TCR de humano. Además, el TCR de la invención puede caracterizarse porque es de origen humano y reconoce específicamente un antígeno TAA de la invención como se menciona en la Tabla 1.

Otra forma de realización de la invención provee adicionalmente o como alternativa la construcción de reconocimiento de antígeno descrito precedentemente, la cual induce una respuesta inmunológica, preferiblemente en donde la respuesta inmunológica se caracteriza por un incremento de niveles de interferón (IFN) γ .

Los TCR de la invención pueden proveerse como moléculas de cadena simple α o β , o γ y δ , o alternativamente como construcciones de cadena doble compuestas por la cadena α y β , o la cadena γ y δ .

Más preferiblemente, en algunas formas de realización adicionales, en donde la divulgación se refiere a las construcciones de reconocimiento antigénico que comprende cualquiera de una, dos o todas las regiones de CDR1 a CDR3 de las cadenas de TCR descritas en la presente (véase Tabla 1), pueden preferirse dichas construcciones de reconocimiento antigénico, las cuales comprenden las respectivas secuencia de CDR de la invención sin más de tres, dos, y preferiblemente solo uno, residuos aminoacídicos modificados. Un residuo de aminoácido modificado puede seleccionarse de una inserción, eliminación o sustitución de aminoácido. Lo más preferido es que tres, dos, preferiblemente solo un residuo de aminoácido modificado sea el primer o último residuo de aminoácido de la respectiva secuencia de CDR. Si la modificación es una sustitución entonces se prefiere en algunas formas de realización que la sustitución sea una sustitución conservativa de aminoácido.

Los TCR de la invención además pueden comprender una región constante derivada de cualquier especie adecuada, tal como de cualquier mamífero, por ejemplo, humano, rata, mono, conejo, burro, o ratón. En una forma de realización de la invención, los TCR de la invención además comprenden una región constante humana. En algunas formas de realización preferidas, la región constante del TCR de la invención puede estar levemente modificado, por ejemplo, por la introducción de secuencias heterólogas, preferiblemente secuencias de ratón, que pueden aumentar la expresión y la estabilidad del TCR.

En una forma de realización de la invención, se provee un TCR quimérico, en donde las cadenas del TCR comprenden secuencias de especies múltiples. Preferiblemente, un TCR de la invención puede comprender una cadena α que comprende una región variable humana de una cadena α y, por ejemplo, una región constante murina de una cadena α de TCR murino.

En una forma de realización, el TCR de la invención es un TCR humano que comprende regiones variables humanas de acuerdo con las formas de realización precedentes y regiones constantes humanas.

En algunas formas de realización la construcción de reconocimiento de antígeno se muriniza o se humaniza. Estos términos se usan cuando las secuencias de aminoácidos de especies foráneas se introducen en una construcción de la invención.

El TCR de la invención puede proveerse como un TCR de cadena individual (TCRcs). Un TCRcs de acuerdo con la invención debe comprender en una cadena polipeptídica una secuencia de cadena alfa completa o parcial y una secuencia de cadena beta completa o parcial, preferiblemente conectadas mediante un conector peptídico. Un TCRcs puede comprender un polipéptido de una región variable de una primera cadena de TCR (por ejemplo, una cadena alfa) y un polipéptido de una cadena de un segundo TCR completo (longitud completa) (por ejemplo, una cadena beta), o viceversa. Además, el TCRcs puede comprender opcionalmente uno o más conectores que unen los dos o más polipéptidos entre sí. El conector puede ser, por ejemplo, un péptido, que une entre sí dos cadenas individuales, como se describe en la presente. También se provee uno de los mencionados TCRcs de la invención, que está fusionado a una citoquina humana, tal como IL-2, IL-7 o IL-15.

La construcción de reconocimiento de antígeno de acuerdo con la invención también puede proveerse en la forma de un complejo multimérico, que comprende por lo menos dos moléculas de TCRs, en donde las mencionadas moléculas de TCRs están cada una fusionada a por lo menos un grupo biotina, u otra molécula/conector de interconexión, y en donde los mencionados TCRs están interconectados por interacción biotina-estreptavidina para permitir la formación del mencionado complejo multimérico. También son posibles estrategias similares conocidas en el arte e incluidas en esta divulgación para la generación de TCR multimérico. También se proveen complejos multiméricos de un orden mayor, que comprenden más de dos TCRs de la invención.

De acuerdo con los propósitos de la presente invención, un TCR es una porción que tiene por lo menos un dominio variable de TCR alfa o gamma y/o TCR beta o delta. En general, comprenden un dominio variable de cadena alfa de TCR y un dominio variable de TCR beta, como alternativa un dominio variable de TCR gamma y un dominio variable de TCR delta. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta/\gamma\delta$ o pueden tener un formato de cadena simple. Para usar en terapia adaptada, puede transfectarse TCR heterodimérico $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, por ejemplo, como cadenas de longitud completa que tienen dominios citoplasmático y transmembrana. Si se desea, puede haber presentes enlaces disulfuro introducidos entre residuos de los respectivos dominios constantes.

En una forma de realización preferida, la construcción de reconocimiento de antígeno es un TCR humano, o fragmento o derivado del mismo. Un TCR humano o fragmento o derivado del mismo es un TCR, el cual comprende más del 50% de la secuencia correspondiente del TCR humano. Preferiblemente,

solo una pequeña parte de la secuencia del TCR es de origen artificial o derivada de otras especies. Se sabe, sin embargo, que los TCR quiméricos, por ejemplo, derivados de origen humano con secuencias murinas en los dominios constantes, son ventajosos. Particularmente se prefieren, por lo tanto, los TCR de acuerdo con la presente invención, los cuales contienen secuencias murinas en la parte extracelular de sus dominios constantes.

Por lo tanto, también se prefiere que la construcción de reconocimiento de antígeno de la invención tenga la capacidad de reconocer su antígeno de un modo dependiente del antígeno leucocitario humano (HLA), preferiblemente de un modo dependiente de HLA-A02. El término "modo dependiente de HLA" en el contexto de la presente invención se refiere a que la construcción de reconocimiento de antígeno se une al antígeno solamente en el caso en que el péptido antigénico es presentado por el mencionado HLA.

La construcción de reconocimiento de antígeno de acuerdo con la invención en una forma de realización preferiblemente induce una respuesta inmunológica, preferiblemente en donde la respuesta inmunológica se caracteriza por el aumento en los niveles de interferón (IFN) γ .

En la invención también se provee un polipéptido que comprende una porción funcional de cualquiera de los TCR (o variante funcional de los mismos) descritos en la presente, por ejemplo, de cualquiera de los TCR provistos en la sección de ejemplos y en la Tabla 2. El término "polipéptido" como se usa en la presente incluye oligopéptidos y se refiere a una cadena individual de aminoácidos conectada por uno o más enlaces peptídicos. Respecto a los polipéptidos de la invención, la porción funcional puede ser cualquier porción que comprende aminoácidos contiguos del TCR (o variante funcional del

mismo), del cual es parte, con la condición que la porción funcional se une específicamente al antígeno TAA, preferiblemente como se describe en la presente en la Tabla 1. El término “porción funcional” cuando se usa en referencia a un TCR (o variante funcional del mismo) se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR (o variante funcional del mismo) de la invención, cuya parte o fragmento retiene la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo), del cual es parte (el TCR parental o variante funcional parental del mismo). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR (o variante funcional del mismo) que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno TAA (de un modo dependiente de HLA), o detectar, tratar, o prevenir el cáncer, en una medida similar, del mismo modo, o en mayor medida, que el TCR parental (o variante funcional del mismo). En referencia al TCR parental (o variante funcional del mismo), la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, o más, de las secuencias variables del TCR parental (o variante funcional del mismo).

La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo terminal de la porción, o en ambos extremos terminales, en donde los aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR parental o variante funcional del mismo. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, específicamente la unión a los antígenos TAA; y/o tienen la capacidad de detectar cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la

actividad biológica, en comparación a la actividad biológica del TCR parental o variante funcional del mismo.

En algunos casos, la construcción de la invención puede comprender una o dos cadenas polipeptídicas que comprenden secuencias de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 39 a 86 (secuencias de CDR, regiones constantes y variables y secuencias de longitud completa), o fragmentos funcionales de las mismas, y que además contengan otras secuencias de aminoácidos, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que codifica para una inmunoglobulina o una porción de la misma, entonces la proteína de la invención puede ser una proteína de fusión. En este sentido, la invención también provee una proteína de fusión que comprende por lo menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente junto con por lo menos un polipéptido adicional. El polipéptido adicional puede existir como un polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede existir como un polipéptido, el cual se expresa en marco (en tándem) con uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente. El otro polipéptido puede incluir cualquier molécula peptídica o proteinácea, o una porción de la misma, que incluye, a título enunciativo no taxativo una inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula de MHC, una molécula CD1, por ejemplo, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

La proteína de fusión puede comprender una o más copias del polipéptido de la invención y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, o más copias del polipéptido de la invención y/o del otro polipéptido. Los métodos adecuados para fabricar proteínas de fusión se conocen en el arte, e incluyen, por ejemplo, métodos recombinantes. En algunas formas de realización de la invención, los

TCR (y porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, y proteínas de la invención pueden expresarse como una proteína individual que comprende un conector péptido uniendo la cadena α y la cadena β , y uniendo la cadena γ y la cadena δ . En este sentido, los TCR (y variantes funcionales y porciones funcionales de los mismos), polipéptidos, y proteínas de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del TCR de la invención y además pueden comprender un péptido conector. El conector péptido puede facilitar ventajosamente la expresión de un TCR recombinante (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), polipéptido, y/o proteína en una célula huésped. El conector péptido puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. Las secuencias conectoras de las construcciones de TCR de cadena individual son bien conocidas en el arte. Dicha construcción de cadena individual además puede comprender una, o dos, secuencias de dominio constante. Cuando la construcción que incluye el conector péptido es expresada por una célula huésped, el conector péptido también puede escindirse, dando como resultado las cadenas α y β separadas, y las cadenas γ y δ separadas.

Tal como se mencionó precedentemente, la funcionalidad de unión del TCR de la invención puede ser provista en el esqueleto de un anticuerpo. Por ejemplo, las secuencias de CDR del TCR de la invención, posiblemente que incluyen 3, 2 o 1 residuos de esqueleto N y/o C terminales adicionales, pueden injertarse directamente en una secuencia de cadena pesada/liviana variable del anticuerpo. El término “anticuerpo” en sus diferentes formas gramaticales se usa en la presente para referirse a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir,

moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno o un paratope. Dichas moléculas también son referidas como “fragmentos de unión a antígeno” de las moléculas de inmunoglobulina. La invención además provee un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, el cual se une específicamente a los antígenos descritos en la presente. El anticuerpo puede ser de cualquier tipo de inmunoglobulina conocida en el arte. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. el anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de origen natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, gallina, hámster, humano, etc. Como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo diseñado genéticamente, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica.

El término “anticuerpo” incluye, a título enunciativo no taxativo, formas de inmunoglobulinas diseñadas genéticamente o modificadas de otro modo, tales como *intrabodies*, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados (por ejemplo generados por “injerto de CDR”), fragmentos de anticuerpo, y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies*, etc.). El término “anticuerpo” incluye *cis-diabodies* y *minibodies*. Por lo tanto, cada una y todas las formas de realización provistas en la presente referidas a “anticuerpos”, o “construcciones similares a anticuerpo” también están contempladas como, formas de realización de anticuerpos biespecíficos, *diabodies*, fragmentos scFv, construcciones quiméricas de receptor de anticuerpo (CAR), *diabody* y/o *minibody*, a menos que se indique de otra

manera. El término “anticuerpo” incluye un polipéptido de la familia de inmunoglobulinas o un polipéptido que comprende fragmentos de una inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse de manera no covalente, reversiblemente, y específica al antígeno correspondiente, preferiblemente el TAA de la invención, como se describe en la presente. Una unidad estructural de anticuerpo ejemplificativa comprende un tetrámero. En algunas formas de realización, un anticuerpo de longitud completa puede estar compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en donde cada par tiene una cadena “liviana” y una “pesada” (conectadas mediante un enlace disulfuro). La estructura del anticuerpo y los isotipos son bien conocidos para una persona con experiencia (por ejemplo de Janeway's Immunobiology, 9^{na} edición, 2016).

Los genes de inmunoglobulina reconocidos de mamíferos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como los numerosos genes de la región variable de inmunoglobulina (para más información sobre los genes de inmunoglobulinas véase el International ImMunoGeneTics information system®, Lefranc M-P y col, Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D413-22; y <http://www.imgt.org/>). Para las cadenas de longitud completa, las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda. Para las cadenas de longitud completa, las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de entre aproximadamente 100 y 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígeno. Los términos cadena liviana variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas regiones de las cadenas

liviana y pesada respectivamente. Como se usa en esta invención, un “anticuerpo” abarca todas las variaciones de anticuerpo y fragmentos del mismo. Por lo tanto, en el alcance de este concepto son anticuerpos de longitud completa, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena individual (scFv), Fab, Fab', y versiones multiméricas de estos fragmentos (por ejemplo, F(ab')₂) con la misma, esencialmente la misma o similar especificidad de unión. En algunas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a un péptido TAA de la invención. Las construcciones de reconocimiento antigénico preferidas de acuerdo con la invención incluyen una cadena pesada de anticuerpo, preferiblemente el dominio variable de la misma, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, y/o una cadena liviana de anticuerpo, preferiblemente el dominio variable de la misma, o un fragmento de unión a antígeno de la misma. Similarmente, los fragmentos de la región variable estabilizados por disulfuro (dsFv) pueden prepararse por tecnología de ADN recombinante, fragmentos de anticuerpo de la invención, sin embargo, no se limitan a estos tipos ejemplificativos de fragmentos de anticuerpo. Además, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, puede modificarse para comprender una marca detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante), y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro). En algunos casos, la secuencia de CDR3 del TCR puede modificarse levemente, pero preferiblemente no más de 3 residuos aminoacídicos, preferiblemente solo dos y aún más preferiblemente solo una posición de aminoácido, como en comparación con las secuencias de CDR3

provistas en SEQ ID Nos: 44, 52, 60, 68, 76 y 84. Preferiblemente, los anticuerpos comprenden la CDR3, preferiblemente todas las regiones de CDR1 a CDR3 en la combinación, como se indicó para el TCR de la invención en la Tabla 2, en cada caso independientemente, opcionalmente con no más de tres o dos, preferiblemente una, sustitución, inserción, y/o eliminación de aminoácido en comparación con estas secuencias.

Los métodos adecuados para hacer anticuerpos son conocidos en el arte. Por ejemplo, se describen métodos de hibridoma estándares en, por ejemplo, Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 51 1-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y C.A. Janeway y col. (eds.), *Immunobiology*, 8 Ed., Garland Publishing, New York, NY (201 1)). Como alternativa, se conocen en el arte otros métodos, tales como métodos de hibridoma de EBV (Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), y Roder y col, *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y sistemas de expresión en vectores de bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse y col., *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Además, los métodos para producir anticuerpos en animales no humanos se describen en, por ejemplo, Patentes de los EE.UU. 5.545.806, 5.569.825, y 5.714.352, y en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 2002/0197266.

Algunas formas de realización de la invención también se relacionan con los TCR, o fragmentos funcionales y polipéptidos de los mismos, que son TCR solubles. Como se usa en la presente, el término “receptor soluble de célula T” se refiere a variantes truncadas heterodiméricas de TCR nativos, que comprenden porciones extracelulares de la cadena α y cadena β del TCR, por ejemplo unidas por un enlace disulfuro, pero que carecen de los dominios

transmembrana y citosólico de la proteína nativa. Los términos "secuencia de la cadena α del receptor soluble de células T y secuencia de la cadena β del receptor soluble de células T " se refieren a las secuencias de la cadena α y de la cadena β del TCR que carecen de los dominios transmembrana y citosólico. Las secuencias (aminoácido o ácido nucleico) de la cadena α y de la cadena β del TCR soluble pueden ser idénticas a las correspondientes secuencias en el TCR nativo o pueden comprender secuencias de la cadena α y de la cadena β del TCR soluble variantes, en comparación con las correspondientes secuencias del TCR nativo. El término "receptor soluble de célula T" como se usa en la presente abarca los TCR solubles con secuencias de la cadena α y de la cadena β del TCR soluble variante o no variante. Las variaciones pueden ser en las regiones variables o constantes de las secuencias de la cadena α y cadena β del TCR soluble y pueden incluir, a título enunciativo no taxativo, mutaciones por eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos así como cambios en la secuencia del ácido nucleico, que no alteren la secuencia de aminoácidos. El TCR soluble de la invención en cualquier caso retiene la funcionalidad de unión de sus moléculas parentales.

DEFINICIONES

Como se usa en la presente y excepto que se indique de otra manera todos los términos se definen como a continuación.

El término "receptor de célula T" (abreviado como TCR) se refiere a una molécula heterodimérica que comprende una cadena polipeptídica alfa (cadena alfa) y una cadena polipeptídica beta (cadena beta), en donde el receptor

heterodimérico tiene la capacidad de unirse a un péptido antígeno presentado por una molécula HLA.

El término “respuesta de célula T” se refiere a la proliferación y activación específica de funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. Para las células T citotóxicas restringidas por MHC de clase I, las funciones efectoras pueden ser la lisis de células blanco pulsadas por péptido, pulsadas por precursores peptídicos o naturalmente presentadoras de péptidos, secreción de citoquinas, preferiblemente interferón-gamma, TNF-alfa, o IL-2 inducido por péptido, secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido, o desgranulación.

El término “péptido” se usa en la presente para designar una serie de residuos aminoacídicos, conectados uno al otro típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilos de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos preferiblemente tienen 9 aminoácidos de longitud, pero pueden ser tan cortos como de 8 aminoácidos de longitud, y tan largos como de 10, 11, o 12 o más, y en el caso de péptidos del MHC de clase II (variantes más largas de los péptidos de la memoria descriptiva) pueden ser tan largos como de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aminoácidos de longitud.

Además, el término “péptido” incluirá sales de una serie de residuos aminoacídicos, conectados uno con el otro típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferiblemente, las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, tales como, por ejemplo, las sales cloruro o acetato (trifluoroacetato). Se ha indicado que las sales de los péptidos de acuerdo con la presente

memoria descriptiva difieren sustancialmente de los péptidos en sus estados *in vivo*, ya que los péptidos no son sales *in vivo*.

El término “péptido” también incluirá “oligopéptido”. El término “oligopéptido” se usa en la presente para designar una serie de residuos aminoacídicos, conectados uno con el otro típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crítica para la memoria descriptiva, siempre que se mantenga el epítope o epítopes correctos en el mismo. Los oligopéptidos típicamente tienen menos de aproximadamente 30 residuos aminoacídicos de longitud, y más de aproximadamente 15 aminoácidos de longitud.

El término “polipéptido” designa una serie de residuos aminoacídicos, conectados uno con el otro típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crítica para la descripción con la condición que se mantengan los epítopes correctos. En contraste con los términos péptido u oligopéptido, el término polipéptido tiene como intención referirse a moléculas que contienen más de aproximadamente 30 residuos aminoacídicos.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica para dicha molécula es “inmunogénico” (y por lo tanto es un “inmunógeno” en la presente memoria descriptiva), si tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunológica. En el caso de la presente descripción, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad de inducir una respuesta de células T. Por lo tanto, un “inmunógeno” podría ser una molécula que tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunológica, y en el caso de la presente descripción, una molécula con capacidad de inducir una respuesta de células

T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con MHC, oligopéptido, y/o proteína que se usa para generar los anticuerpos específicos o TCR contra el mismo.

Un “epitope” de célula T de clase I requiere que se una un péptido corto a un receptor de MHC de clase I, formando un complejo de tres (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina, y péptido) que pueda ser reconocido por una célula T que porta un receptor de células T coincidente unido al complejo MHC/péptido con la afinidad apropiada. Los péptidos que se unen a las moléculas de MHC de clase I típicamente tienen entre 8 y 14 aminoácidos de longitud, y más típicamente 9 aminoácidos de longitud.

La secuencia nucleotídica que codifica para un péptido, oligopéptido, o polipéptido particular puede ser de origen natural o puede ser construido de manera sintética. En general, los segmentos de ADN que codifican para los péptidos, polipéptidos, y proteínas de esta memoria descriptiva se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y conectores de oligonucleótido cortos, o de una serie de oligonucleótidos, para proveen un gen sintético que tiene la capacidad de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos de regulación derivados de un operón microbiano o viral.

Como se usa en la presente el término “un nucleótido que codifica para (o codificante) un péptido” se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para el péptido que incluye codones artificiales (fabricados por el hombre) de inicio y terminación compatibles para el sistema biológico que expresará la secuencia, por ejemplo, una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de los TCR.

Como se usa en la presente el término “un nucleótido que codifica para (o codificante) un TCR” se refiere a una o más secuencias nucleotídicas que codifican para el TCR que incluye codones artificiales (fabricados por el hombre) de inicio y terminación compatibles para el sistema biológico que expresará la secuencia, por ejemplo, célula T u otro sistema celular útil para la producción de los TCR.

Como se usa en la presente, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye ácido nucleico de hebra simple y de hebra doble. Por lo tanto, por ejemplo para ADN, la secuencia específica, a menos que el contexto lo indique de otra manera, se refiere al ADN de hebra simple de dicha secuencia, el dúplex de dicha secuencia con su complemento (ADN de hebra doble) y el complemento de dicha secuencia.

El término “región codificante” se refiere a esa porción de un gen que codifica naturalmente o normalmente para el producto de expresión de ese gen en su ambiente genómico natural, es decir, la región codificante *in vivo* para el producto de expresión nativo del gen.

La región codificante puede derivarse de un gen no mutado (“normal”), mutado o alterado, o incluso puede derivar de una secuencia de ADN, o gen, completamente sintetizado en el laboratorio usando métodos bien conocidos para aquellos con experiencia en el arte de la síntesis de ADN.

El término “producto de expresión” se refiere al polipéptido o proteína que es el producto de traducción natural del gen y cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica para equivalentes que resultan de la degeneración del código genético y por lo tanto codifican para el o los mismos aminoácidos.

El término “fragmento”, cuando se refiere a una secuencia codificante, se refiere a una porción de ADN que comprende menos que la región codificante completa, cuyo producto de expresión retiene esencialmente la misma función o actividad biológica que el producto de expresión de la región codificante completa.

El término “segmento de ADN” se refiere a un polímero de ADN, en la forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ADN más grande, que ha sido derivada de ADN aislado por lo menos una vez en forma sustancialmente pura, es decir, libre de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación, y recuperación del segmento y sus secuencias nucleotídicas componentes por métodos bioquímicos estándares, por ejemplo, usando un vector de clonado. Dichos segmentos se proveen en la forma de un marco de lectura abierto no interrumpido por secuencias no traducidas internas, o intrones, que típicamente están presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes corriente abajo del marco de lectura abierto, en donde las mismas no interfieren con la manipulación o expresión de regiones codificantes.

El término “cebador” se refiere a una secuencia corta de ácido nucleico que puede aparearse con una hebra del ADN y provee un extremo 3'-OH libre en el cual una ADN polimerasa comienza la síntesis de una cadena de desoxiribonucleótidos.

El término “promotor” se refiere a una región de ADN involucrada en la unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

El término “aislado” se refiere a que el material es quitado de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural, si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de parte o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. En un aspecto, dichos polinucleótidos son parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos son parte de una composición, y aún están aislados ya que dicho vector o composición no es parte de su ambiente natural.

Los polinucleótidos, y polipéptidos recombinantes o inmunogénicos, descritos de acuerdo con la presente memoria descriptiva también pueden estar en forma “purificada”. El término “purificado” no requiere la pureza absoluta; sino que se lo pretende como una definición relativa, y puede incluir preparaciones que están muy purificadas o preparaciones que solo están parcialmente purificadas, tal como las personas con experiencia en el arte relevante comprenderán estos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una biblioteca de ADNc han sido purificados convencionalmente hasta la homogeneidad electroforética. La purificación del material de partida o material natural hasta por lo menos un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes, y más preferiblemente cuatro o cinco órdenes de magnitud está expresamente contemplada. Además, un polipéptido que se reivindica que tiene una pureza de preferiblemente 99,999%, o por lo menos 99,99% o 99,9%; e incluso deseablemente 99% en peso o más está expresamente abarcado.

Los ácidos nucleicos y productos de expresión polipeptídicos descritos de acuerdo con la presente memoria descriptiva, así como vectores de

expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden estar en una “forma enriquecida”. Como se usa en la presente, el término “enriquecido” se refiere a que la concentración del material es por lo menos aproximadamente 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), ventajosamente 0,01%, en peso, preferiblemente por lo menos aproximadamente 0,1% en peso. Las preparaciones enriquecidas de aproximadamente 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% en peso también están contempladas. Las secuencias, construcciones, vectores, clones, y otros materiales que comprenden la presente memoria descriptiva pueden estar ventajosamente en la forma enriquecida o aislada. El término “fragmento activo” se refiere a un fragmento, usualmente de una secuencia peptídica, polipeptídica o de ácido nucleico, que genera una respuesta inmunológica (es decir, tiene actividad inmunogénica) cuando se administra, sola u opcionalmente con un adyuvante adecuado o en un vector, a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo, un conejo o un ratón, y también incluye un humano, tal que la respuesta inmunológica toma la forma de estimulación de la respuesta de células T en el animal receptor, tal como un humano. Como alternativa, el “fragmento activo” también puede usarse para inducir una respuesta de células T *in vitro*.

Como se usa en la presente, los términos “porción”, “segmento” y “fragmento”, cuando se usan en relación a polipéptidos, se refieren a una secuencia continua de residuos, tales como residuos aminoacídicos, cuya secuencia forma un subconjunto de una secuencia más grande. Por ejemplo, si un polipéptido fue sometido a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas comunes, tales como tripsina o quimiotripsina, los

oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento podrían representar porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Cuando se usan en relación a polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de los mencionados polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

De acuerdo con la presente memoria descriptiva, el término “identidad porcentual” o “por ciento idéntico”, cuando se refiere a una secuencia, indica que una secuencia se compara con una secuencia que se reivindica o descrita después del alineamiento de la secuencia a comparar (la “secuencia comparada”) con la secuencia descrita o que se reivindica (la “secuencia de referencia”). La identidad porcentual luego se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Identidad porcentual} = 100 [1 - (C/R)]$$

en donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada en la longitud de alineamiento entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, en donde

(i) cada base o aminoácido en la secuencia de referencia no tiene una base o aminoácido alineado correspondientemente en la secuencia comparada y

(ii) cada no coincidencia en la secuencia de referencia y

(iii) cada base o aminoácido alineado en la secuencia de referencia que es diferente de una base o aminoácido alineado en la secuencia comparada, constituye una diferencia y

(iv) el alineamiento tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

y R es el número de bases o aminoácidos en la secuencia de referencia en la longitud del alineamiento con la secuencia comparada con cualquier no coincidencia creada en la secuencia de referencia siendo contada como una base o aminoácido.

Si existe un alineamiento entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para el cual la identidad porcentual calculada de acuerdo a lo precedente es aproximadamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima específica entonces la secuencia comparada tiene la identidad porcentual mínima específica con la secuencia de referencia a pesar que pueden existir alineamientos en los cuales la identidad porcentual calculada precedentemente en la presente es menor que la identidad porcentual específica.

En la descripción, el término “homólogo” se refiere al grado de identidad (véase identidad porcentual precedentemente) entre secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir, secuencias peptídicas o polipeptídicas. La “homología” mencionada precedentemente se determina por comparación de dos secuencias alineadas bajo condiciones óptimas a lo largo de las secuencias a comparar. Dicha homología de secuencia puede calcularse por creación de un alineamiento usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW. En bases de datos públicas se proveen programas de computación de análisis de secuencia disponibles comúnmente, más específicamente, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas.

Una persona con experiencia en el arte tendrá la capacidad de evaluar, si las células T inducidas por una variante de un péptido específico tendrán la

capacidad de reaccionar de manera cruzada con el péptido mismo (Appay y *col.*, 2006; Colombetti y *col.*, 2006; Fong y *col.*, 2001; Zaremba y *col.*, 1997).

Por una “variante” de una secuencia dada de aminoácidos, los inventores se refieren a que las cadena laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos aminoacídicos están alterados (por ejemplo por reemplazo de los mismos por la cadena lateral de otro residuo de aminoácido de origen natural o alguna otra cadena lateral) tal que el péptido aún tenga la capacidad de unirse a una molécula de HLA sustancialmente de la misma manera que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos dada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24. Por ejemplo, un péptido puede modificarse de manera que por lo menos mantiene, si no mejora, la capacidad de interaccionar con y unirse al surco de unión de una molécula de MHC adecuada, tal como HLA-A*02 o -DR, y de manera que por lo menos mantiene, si no mejora, la capacidad de unirse al TCR de los linfocitos T activados. Similarmente, un TCR puede modificarse de manera que por lo menos mantiene, si no mejora, la capacidad de interaccionar con y unirse a un complejo de molécula adecuada de MHC/KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1), tal como HLA-A*02 o -DR, y de manera que por lo menos mantiene, si no mejora, la capacidad de activar a las células T.

Estas células T pueden posteriormente reaccionar de manera cruzada con células y matar células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos natural del péptido análogo, tal como KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1), como se define en los aspectos de la memoria descriptiva. Tal como puede derivarse de la literatura científica y bases de datos (Rammensee y *col.*, 1999; Godkin y *col.*, 1997), determinadas posiciones de los péptidos de

unión a HLA típicamente son residuos de anclaje que forman una secuencia central que se ajusta al motivo de unión del receptor de HLA, definido por propiedades de polaridad, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen el surco de unión. En un aspecto, una persona con experiencia en el arte podría tener la capacidad de acuerdo a las descripciones de la memoria descriptiva de modificar la secuencia de aminoácidos de un TCR, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y podría tener la capacidad de determinar si dichas variantes de TCR mantienen la capacidad de unirse a los complejos de moléculas de MHC de clase I o II/KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1). Las variantes de TCR de la memoria descriptiva retienen la capacidad de unirse a complejos de moléculas de MHC de clase I o II/KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1). Las células T que expresan las variantes de TCR de la memoria descriptiva pueden posteriormente matar células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos natural del péptido análogo, tal como KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1).

En un aspecto, los péptidos o TCR descritos en la presente pueden modificarse por la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, en la cadena peptídica, si no se indica de otra manera. Preferiblemente aquellas sustituciones están localizadas en el extremo de la cadena de aminoácidos del péptido mencionado. Para los TCR, preferiblemente aquellas sustituciones están localizadas en dominios variables de la cadena alfa de TCR y de la cadena beta de TCR. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservativa, por ejemplo, en donde un aminoácido está reemplazados por un aminoácido de estructura y características similares, tal como cuando un aminoácido hidrofóbico es reemplazado por otro

aminoácido hidrofóbico. Incluso más conservativo sería el reemplazo de aminoácidos del tamaño y naturaleza química igual o similar, tal como cuando la leucina se reemplaza por isoleucina. En estudios de variaciones de secuencia en familias de proteínas homólogas de origen natural, determinadas sustituciones de aminoácido son más frecuentemente toleradas que otras, y estas con frecuencia muestran correlación con similitudes en tamaño, carga, polaridad, e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, y tal es la base para definir “sustituciones conservativas”.

Las sustituciones conservativas en la presente se definen como intercambios en uno de los siguientes cinco grupos: Grupo 1-residuos alifáticos pequeños, no polares o levemente polares (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Grupo 2-residuos polares, cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); Grupo 3-residuos polares, cargados positivamente (His, Arg, Lys); Grupo 4-residuos grandes, alifáticos, no polares (Met, Leu, Ile, Val, Cys); y Grupo 5-residuos grandes, aromáticos (Phe, Tyr, Trp).

Las sustituciones menos conservativas podrían involucrar el reemplazo de un aminoácido por otro que tiene las mismas características pero que es un poco diferente en tamaño, tal como el reemplazo de una alanina por un residuo de isoleucina. Los reemplazos altamente no conservativos podrían involucrar la sustitución de un aminoácido ácido por uno que es polar, o incluso uno que es de carácter básico. Dichas sustituciones “radicales” no pueden, sin embargo, ser desestimadas como potencialmente ineficaces ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales podrían dar lugar a efectos casuales no predecibles de otra manera a partir de los principios químicos simples.

En un aspecto, dichas sustituciones pueden involucrar estructuras diferentes de los L-aminoácidos comunes. Por lo tanto, los D-aminoácidos podrían sustituirse por los L-aminoácidos encontrados comúnmente en los péptidos antigénicos de la memoria descriptiva y aún estar abarcados por la divulgación en la presente. Además, los aminoácidos no estándares (es decir, diferentes de los aminoácidos proteinogénicos de origen natural comunes) también pueden usarse con propósitos de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos de acuerdo con la presente memoria descriptiva.

Si se encuentra que las sustituciones en más de una posición dan como resultado un péptido con sustancialmente una actividad antigénica equivalente o mayor como se define más adelante, entonces se estudiarán combinaciones de aquellas sustituciones para determinar si las sustituciones combinadas dan como resultado efectos aditivos o sinérgicos sobre la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán simultáneamente no más de 4 posiciones en el péptido.

Como se usa en la presente, el término “murino” o “humano”, cuando se refiere a una construcción de reconocimiento antigénico, o un TCR, o cualquier componente de un TCR descrito en la presente (por ejemplo, región determinante de complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena α , y/o cadena β), se refiere a un TCR (o componente del mismo), que deriva de un *locus* de TCR no rearreglado de ratón o humano, respectivamente.

RECEPTORES DE CÉLULAS T (TCR)

En una forma de realización preferida, la memoria descriptiva se relaciona con un TCR que comprende una cadena alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2, y variantes de la misma; y una cadena beta de TCR que se muestra en la Tabla 2, y variantes de la misma. En un aspecto, un TCR descrito en la presente tiene la capacidad de unirse o unirse específicamente a una molécula del complejo de complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I/KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1) o a complejo de clase II/KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1).

Tabla 2: TCR representativos de acuerdo con presente memoria descriptiva

TCR ID	Descripción	Secuencia
R20P1 H7 cadena alfa	cadena alfa	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQ EGESSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFT LYSAGEEKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATY LCAVQGENSGYSTLTFGKGTMLLVSPDIQNPDPVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:39)
	Segmento L (TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSG (SEQ ID NO:40)

	Cadena V (TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQ EGESSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFT LYSAGEEKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATY LCAVQ (SEQ ID NO:41)
	CDR1	VSGLRG (SEQ ID NO:42)
	CDR2	LYS (SEQ ID NO:43)
	CDR3	CAVQGENSGYSTLTF (SEQ ID NO:44)
	Segmento J (TRAJ11)	NSGYSTLTFGKGTMLLVSP (SEQ ID NO:45)
	Región constante (TRAC)	DIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNK SDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:46)
R20P1 H7 cadena beta	cadena beta	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGK KLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNV EVTDKGDVPEGYKVS RKEKRNFLILESPSPNQ TSL YFCASSLGPGAAYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSS RLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:47)

	Segmento L (TRBV27)	MGPQLLGYVVLCLLGAGPL (SEQ ID NO:48)
	Cadena V (TRBV27)	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGK KLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNV EVTDKGDVPEGYKVS RKEKRNFLILESPSPNQTSL YFCASSL (SEQ ID NO:49)
	CDR1	MNHEY (SEQ ID NO:50)
	CDR2	SMNVEV (SEQ ID NO:51)
	CDR3	CASSLGPGLAAYNEQF (SEQ ID NO:52)
	Cadena J (TRBJ2-1)	YNEQFFGPGTRLTVL (SEQ ID NO:53)
	región constante (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSR G (SEQ ID NO:54)

R7P1D 5 cadena alfa	cadena alfa	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVRE GDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFS NMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAEYSSASKIIFGSGTRLSIRPNIQNPDPNAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:55)
	Segmento L (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR (SEQ ID NO:56)
	Cadena V (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVRE GDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFS NMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIY FCAE (SEQ ID NO:57)
	CDR1	DSSSTY (SEQ ID NO:58)
	CDR2	IFS (SEQ ID NO:59)
	CDR3	CAEYSSASKIIF ((SEQ ID NO:60)
	Segmento J (TRAJ3)	YSSASKIIFGSGTRLSIRP (SEQ ID NO:61)
	Región constante (TRAC)	NIQNPDPNAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDT NLFQNL SVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:62)

R7P1D 5 cadena beta	cadena beta	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQ EVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCASRANTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAV FEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNG KEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQ IVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:63)
	Segmento L (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHT (SEQ ID NO:64)
	Cadena V (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQ EVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNV PIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAV YFCAS (SEQ ID NO:65)
	CDR1	SGHDY (SEQ ID NO:66)
	CDR2	FNNNVP (SEQ ID NO:67)
	CDR3	CASRANTGELFF (SEQ ID NO:68)
	Cadena J (TRBJ2-1)	NTGELFFGEGSRLTVL (SEQ ID NO:69)

	región constante (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSR G (SEQ ID NO:70)
R10P2 G12 cadena alfa	cadena alfa	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKE DVTLDVCYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNS FDEQNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVD SAV YFCALSEGNSGNTPLVFGKGTRL SVIANIQNPDP AVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSII PEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:71)
	Segmento L (TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVVSSM (SEQ ID NO:72)
	Cadena V (TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKE DVTLDVCYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNS FDEQNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVD SAV YFCALSE (SEQ ID NO:73)
	CDR1	TRDTTY (SEQ ID NO:74)
	CDR2	RNSF (SEQ ID NO:75)
	CDR3	CALSEGNSGNTPLVF (SEQ ID NO:76)

	Segmento J (TRAJ29)	NSGNTPLVFGKGTRLSVIA (SEQ ID NO:77)
	Región constante (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:78)
R10P2 G12 cadena beta	cadena beta	MGIRLLCRVAF C FLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGE KVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDV KMKEKGD IPEGYSVSREKKERFSLILESASTNQ TSM YLCASSLSSGSHQETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPP EVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFR C QVQFYGLSENDEWTQDRA KPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:79)
	Segmento L (TRBV28)	MGIRLLCRVAF C FLAVGLV (SEQ ID NO:80)
	Cadena V (TRBV28)	MGIRLLCRVAF C FLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGE KVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDV KMKEKGD IPEGYSVSREKKERFSLILESASTNQ TSM YLCASSL (SEQ ID NO:81)
	CDR1	MDHEN (SEQ ID NO:82)
	CDR2	SYDVKM (SEQ ID NO:83)

	CDR3	CASSLSSGSHQETQYF (SEQ ID NO:84)
	Cadena J (TRBJ2-5)	QETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID NO:85)
	región constante (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSR G (SEQ ID NO:86)

Las cadenas alfa y beta de los TCR alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los TCR gamma/delta, en general son considerados como que tienen dos “dominios”, es decir dominios variable y constante. El dominio variable consiste en una concatenación de región variable (V), y región de asociación (J). El dominio variable también puede incluir una región líder (L). Las cadenas beta y delta también pueden incluir una región de diversidad (D). Los dominios constantes alfa y beta también pueden incluir los dominios transmembrana (TM) del extremo C terminal que anclan las cadenas alfa y beta a la membrana de la célula.

En la presente memoria descriptiva, el término "dominio variable del TCR alfa" por lo tanto se refiere a la concatenación de la región V del TCR alfa (TRAV) sin la región líder (L), y la región J del TCR alfa (TRAJ); y el término “dominio constante del TCR alfa” se refiere a la región TRAC extracelular, o a la secuencia TRAC truncada del extremo C terminal, y opcionalmente un dominio transmembrana de alfa (VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO:87)).

Similarmente el término “dominio variable de TCR beta” se refiere a la concatenación de la región V del TCR beta (TRBV) sin la región líder (L), y la región beta D/J del TCR (TRBD/TRBJ); y el término dominio constante de cadena beta de TCR se refiere a la región TRBC extracelular, o a una secuencia TRBC truncada en el extremo C terminal, y opcionalmente un dominio transmembrana beta (TILYEILLGKATLYAVLVLSALVL (SEQ ID NO:88)).

Respecto a TCR gamma/delta, el término “dominio variable del TCR gamma” como se usa en la presente se refiere a la concatenación de regiones V del TCR gamma (TRGV) sin la región líder (L), y regiones J del TCR gamma J (TRGJ); y el término dominio constante del TCR gamma se refiere a la región TRGC extracelular, o a una secuencia TRGC truncada en el extremo C terminal. Similarmente el término "dominio variable de TCR delta" se refiere a la concatenación de las regiones V del TCR delta (TRDV) sin la región líder (L), y las regiones D/J del TCR delta (TRDD/TRDJ); y el término dominio constante del TCR delta se refiere a la región TRDC extracelular, o a una secuencia TRDC truncada en extremo C terminal.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende o consiste en una cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, a una cadena alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2. Las cadenas alfa de TCR que se muestran en la Tabla 2 contienen un segmento líder (L); una cadena V; tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3); una región de asociación (J) y una región constante, como se define en la Tabla 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende o consiste en un dominio variable de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a un dominio variable de cadena alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende o consiste en, un dominio constante de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 75% idéntico a un dominio constante de cadena alfa de TCR que se muestra en la Tabla 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa que se selecciona del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa que se muestra en la Tabla 2. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende una CDR3 de cadena alfa que se muestra en la Tabla 2. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa que se muestra en la Tabla 2.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, un dominio variable de cadena alfa de TCR que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena alfa de TCR de la Tabla 2, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 del mismo dominio variable de cadena alfa de la Tabla 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, una cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, a una cadena beta de TCR que se muestra en la Tabla 2. Las cadenas beta de TCR que se muestran en la Tabla 2 contienen un segmento líder (L); una cadena V; tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3); una región de asociación (J) y una región constante, como se define en la Tabla 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, un dominio variable de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a un dominio variable de cadena beta de TCR que se muestra en la Tabla 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, un dominio constante de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 75% idéntico, a un dominio constante de cadena beta de TCR que se muestra en la Tabla 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena beta que se selecciona del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta que se muestran en la Tabla 2. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende una CDR3 de cadena beta que se muestra en la Tabla 2. En otra forma de

realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta que se muestran en la Tabla 2.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, un dominio variable de cadena beta de TCR que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con un dominio variable de cadena beta de TCR de la Tabla 2, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 del mismo dominio variable de cadena beta de TCR de la Tabla 2.

El dominio variable de la cadena alfa puede comprender uno o más dominios de CDR alfa que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR que se muestra en la Tabla 2. Similarmente, el dominio variable de la cadena beta puede comprender uno o más dominios de CDR beta que tiene una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR beta que se muestra en la Tabla 2.

La cadena alfa de TCR y la cadena beta de TCR pueden fusionarse para formar un TCR de cadena individual. Como alternativa, las cadenas alfa y beta de TCR pueden expresarse como proteínas separadas que pueden ensamblarse en un heterodímero.

En una forma de realización, cualquier cadena alfa de TCR de la Tabla 2 se aparea con cualquier cadena beta de TCR de la Tabla 2 para producir un TCR que se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA.

TCR R20P1H7

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, la cadena alfa y/o cadena beta de TCR R20P1H7, que corresponde a las SEQ ID NOs:39 y 47, respectivamente.

El dominio variable de cadena alfa de TCR R20P1H7 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 22 a 133 de SEQ ID NO:39; el dominio constante de cadena alfa de TCR de TCR R20P1H7 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 134-275 de SEQ ID NO:39; el dominio variable de cadena beta de TCR de TCR R20P1H7 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 20 a 135 de SEQ ID NO:47; y el dominio constante de cadena beta de TCR comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 136 a 315 de SEQ ID NO:47.

En una forma de realización particular, un TCR de la presente descripción comprende una cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, a la cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:39.

En otra forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, al dominio variable de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:39.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico,

preferiblemente 75% idéntico, al dominio constante de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:39.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa que se selecciona del grupo que consiste en las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:39. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:39. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:39.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con el dominio variable de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:39, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:39.

En otra forma de realización particular, un TCR de la presente descripción comprende una cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, a la cadena beta de TCR de SEQ ID NO:47.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico,

preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, al dominio variable de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:47.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 75% idéntico, al dominio constante de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:47.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena beta que se selecciona del grupo que consiste en las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:47. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:47. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:47.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con el dominio variable de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:47, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:47.

El dominio variable de la cadena alfa puede comprender uno o más dominios de CDR alfa que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR de SEQ ID NO:39. Similarmente, el dominio variable de la cadena beta puede comprender

uno o más dominios de CDR beta que tiene una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR beta de SEQ ID NO:47.

TCR R7P1D5

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, la cadena alfa y/o cadena beta de TCR R7P1D5, que corresponde a las SEQ ID NOs:55 y 63, respectivamente.

El dominio variable de cadena alfa de TCR R7P1D5 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 22 a 131 de SEQ ID NO:55; el dominio constante de cadena alfa de TCR de TCR R7P1D5 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 132 a 272 de SEQ ID NO:55; el dominio variable de cadena beta de TCR de TCR R7P1D5 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 20 a 131 de SEQ ID NO:63; y el dominio constante de cadena beta de TCR comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 132 a 310 de SEQ ID NO:63.

En una forma de realización particular, un TCR de la presente descripción comprende una cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, a la cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:55.

En otra forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, al dominio variable de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:55.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 75% idéntico, al dominio constante de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:55.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa que se selecciona del grupo que consiste en las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:55. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:55. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:55.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con el dominio variable de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:55, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:55.

En otra forma de realización particular, un TCR de la presente descripción comprende una cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90% o 95% idéntica, a la cadena beta de TCR de SEQ ID NO:63.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, al dominio variable de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:63.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 75% idéntico, al dominio constante de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:63.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena beta que se selecciona del grupo que consiste en las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:63. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:63. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:63.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con el dominio variable de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:63, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:63.

El dominio variable de la cadena alfa puede comprender uno o más dominios de CDR alfa que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR de SEQ ID NO:55. Similarmente, el dominio variable de la cadena beta puede comprender uno o más dominios de CDR beta que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR beta de SEQ ID NO:63.

TCR R10P2G12

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, la cadena alfa y/o cadena beta de TCR R10P2G12, que corresponde a las SEQ ID NOs:71 y 79, respectivamente.

El dominio variable de cadena alfa de TCR R10P2G12 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 21 a 136 de SEQ ID NO:71; el dominio constante de cadena alfa de TCR de TCR R10P2G12 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 137 a 277 de SEQ ID NO:71; el dominio variable de cadena beta de TCR de TCR R10P2G12 comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 20 a 134 de SEQ ID NO:79; y el dominio constante de cadena beta de TCR comprende, o como alternativa consiste en, los aminoácidos 135 a 313 de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización particular, un TCR de la presente descripción comprende una cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, a la cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:71.

En otra forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, al dominio variable de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:71.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena alfa de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 75% idéntico, al dominio constante de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:71.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa que se selecciona del grupo que consiste en las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:71. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende la CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:71. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:71.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con el dominio variable de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:71, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:71.

En otra forma de realización particular, un TCR de la presente descripción comprende una cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica, a la cadena beta de TCR de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, al dominio variable de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena beta de TCR por lo menos 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico, preferiblemente 75% idéntico, al dominio constante de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena beta que se selecciona del grupo que consiste en las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:79. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende la CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:79. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización particularmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que tiene por lo menos 90% o 95% de identidad de secuencia con el dominio variable de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:79, y comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO:79.

El dominio variable de la cadena alfa puede comprender uno o más dominios de CDR alfa que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR de SEQ ID NO:71. Similarmente, el dominio variable de la cadena beta puede comprender uno o más dominios de CDR beta que tienen una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en relación a la correspondiente secuencia de CDR beta de SEQ ID NO:79.

En una forma de realización preferida adicional, un TCR de la presente descripción se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA, en donde el péptido MAG-003 se selecciona de KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1) y variantes del mismo, tales como aquellas que se muestran en SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:24. En una forma de realización la molécula de HLA es una molécula de MHC de clase I seleccionada del grupo que consiste en las moléculas HLA-A, HLA-B, y HLA-C. En una forma de realización la molécula de HLA es HLA-A*02. En otra forma de realización, la molécula de HLA es una molécula de MHC de clase II seleccionada del grupo que consiste en HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR.

Los TCR de la presente descripción preferiblemente se unen a un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA con una afinidad de unión (K_D) de aproximadamente 100 μ M o menor, aproximadamente 50 μ M o menor,

aproximadamente 25 μ M o menor, o aproximadamente 10 μ M o menor. Se prefieren más los TCR de alta afinidad que tienen afinidades de unión de aproximadamente 1 μ M o menor, aproximadamente 100 nM o menor, aproximadamente 50 nM o menor, aproximadamente 25 nM o menor. Los ejemplos no limitantes de rangos preferidos de afinidad de unión para los TCR de la presente descripción incluyen entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 nM; entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 20 nM; entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 30 nM; entre aproximadamente 30 nM y aproximadamente 40 nM; entre aproximadamente 40 nM y aproximadamente 50 nM; entre aproximadamente 50 nM y aproximadamente 60 nM; entre aproximadamente 60 nM y aproximadamente 70 nM; entre aproximadamente 70 nM y aproximadamente 80 nM; entre aproximadamente 80 nM y aproximadamente 90 nM; y entre aproximadamente 90 nM y aproximadamente 100 nM.

Tal como se usa en la presente en relación a los TCR de la presente descripción, “unión específica” y sus variantes gramaticales se usan para referirse a un TCR que tiene una afinidad de unión (K_D) por un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA de 100 μ M o menor.

Los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener un enlace disulfuro introducido entre sus dominios constantes. Los TCR preferidos de este tipo incluyen aquellos que tienen una secuencia de dominio constante de TRAC y una secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2 excepto que la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 están reemplazadas por residuos cisteína, y las mencionadas cisteínas forman un

enlace disulfuro entre la secuencia del dominio constante de TRAC y la secuencia del dominio constante de TRBC1 o TRBC2 del TCR.

Con o sin el enlace intercadena introducido mencionado precedentemente, los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener una secuencia del dominio constante de TRAC y una secuencia del dominio constante de TRBC1 o TRBC2, y la secuencia del dominio constante de TRAC y la secuencia del dominio constante de TRBC1 o TRBC2 del TCR pueden estar unidas por el enlace disulfuro nativo entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 del TRBC1 o TRBC2.

Los TCR de la presente descripción pueden comprender una marca detectable seleccionada del grupo que consiste en un radionúclido, un fluoróforo y biotina. Los TCR de la presente descripción pueden estar conjugados a un agente terapéuticamente activo, tal como un radionúclido, un agente quimioterapéutico, o una toxina.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción que tiene por lo menos una mutación en la cadena alfa y/o que tiene por lo menos una mutación en la cadena beta tiene una glicosilación modificada en comparación con el TCR no mutado.

En una forma de realización, un TCR que comprende por lo menos una mutación en la cadena alfa de TCR y/o TCR cadena beta tiene una afinidad de unión por, y/o una vida media de unión por, un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA, que es por lo menos el doble de la de un TCR que comprende la cadena alfa de TCR no mutada y/o la cadena beta de TCR no mutada. El mejoramiento de la afinidad de los TCR específicos de tumor, y su utilización, se basa en la existencia de una ventana para las afinidades de TCR óptimas.

La existencia de dicha ventana se basa en observaciones de que los TCR específicos por patógenos restringidos a HLA-A2 tienen valores de *KD* que en general aproximadamente son 10 veces menores cuando se compara con los TCR específicos por autoantígenos asociados a tumor restringidos por HLA-A2 (Aleksic y col. 2012; Kunert y col. 2013). Ahora se sabe, a pesar que los antígenos tumorales tienen el potencial de ser inmunogénicos, que como los tumores surgen de las células propias de los individuos solo las proteínas mutadas o las proteínas con procesamiento de traducción alterado serán vistas como foráneas por el sistema inmunológico. Los antígenos que tienen una regulación aumentada o sobreexpresados (los llamados autoantígenos) no necesariamente inducirán una respuesta inmunológica funcional contra el tumor: células T que expresan TCR que son muy reactivos contra estos antígenos habrán sido seleccionados negativamente en el timo en un proceso conocido como tolerancia central (Xing y col. 2012; Ruella y col. 2014; Sharpe y col. 2015), que significa que solo permanecerán las células T con TCR de baja afinidad para los autoantígenos. Por lo tanto, se ha mejorado la afinidad de los TCR o variantes de la presente descripción contra MAG-003 mediante métodos bien conocidos en el arte como se describió precedentemente.

PÉPTIDOS MAG-003

La memoria descriptiva provee un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24 o una variante de la misma que es 88% homóloga a SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:24, o una variante de la misma que inducirá la reacción cruzada de células T con un péptido descrito en la presente. En un aspecto, los péptidos de la memoria descriptiva tienen la capacidad de unirse a una molécula del

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I humano o versiones más grandes de un péptido descrito en la presente a los de clase II. En un aspecto, un TCR descrito en la presente tiene la capacidad de unirse o de unirse específicamente a un péptido descrito en la presente.

En humanos hay tres *loci* genéticos diferentes que codifican para las moléculas de MHC de clase I (las moléculas de MHC del humano también se designan como antígenos leucocitarios humanos (HLA)): HLA-A, HLA-B, y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, y HLA-B*07 son ejemplos de diferentes alelos de los MHC de clase I que pueden expresarse a partir de esos *loci*.

Tabla 3: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos de HLA-DR más frecuentes. Las frecuencias son deducidas de las frecuencias de haplotipos Gf de la población Americana adaptado de Mori y *col.* (Mori y *col.*, 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F = 1 - (1-Gf)^2$. Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos de HLA-DR podrían estar enriquecidas o ser menos frecuentes que lo esperado respecto a sus frecuencias individuales debido al desequilibrio de unión. Para detalles referirse a Chanock y *col.* (Chanock y *col.*, 2004).

Tabla 3

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia de alelos
A*02	Caucásica (América del Norte)	49,1%
A*02	Áfrico-americana (América del Norte)	34,1%
A*02	Asiático-americana (América del Norte)	43,2%
A*02	Latinoamericana (América del Norte)	48,3%

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia de alelos
DR1	Caucásica (América del Norte)	19,4%
DR2	Caucásica (América del Norte)	28,2%
DR3	Caucásica (América del Norte)	20,6%
DR4	Caucásica (América del Norte)	30,7%
DR5	Caucásica (América del Norte)	23,3%
DR6	Caucásica (América del Norte)	26,7%
DR7	Caucásica (América del Norte)	24,8%
DR8	Caucásica (América del Norte)	5,7%
DR9	Caucásica (América del Norte)	2,1%
DR1	Áfrico-(Norte) americana	13,20%
DR2	Áfrico-(Norte) americana	29,80%
DR3	Áfrico-(Norte) americana	24,80%
DR4	Áfrico-(Norte) americana	11,10%
DR5	Áfrico-(Norte) americana	31,10%
DR6	Áfrico-(Norte) americana	33,70%
DR7	Áfrico-(Norte) americana	19,20%
DR8	Áfrico-(Norte) americana	12,10%
DR9	Áfrico-(Norte) americana	5,80%
DR1	Asiático-(Norte) americana	6,80%
DR2	Asiático-(Norte) americana	33,80%
DR3	Asiático-(Norte) americana	9,20%
DR4	Asiático-(Norte) americana	28,60%

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia de alelos
DR5	Asiático-(Norte) americana	30,00%
DR6	Asiático-(Norte) americana	25,10%
DR7	Asiático-(Norte) americana	13,40%
DR8	Asiático-(Norte) americana	12,70%
DR9	Asiático-(Norte) americana	18,60%
DR1	Latino (Norte) americana	15,30%
DR2	Latino (Norte) americana	21,20%
DR3	Latino (Norte) americana	15,20%
DR4	Latino (Norte) americana	36,80%
DR5	Latino (Norte) americana	20,00%
DR6	Latino (Norte) americana	31,10%
DR7	Latino (Norte) americana	20,20%
DR8	Latino (Norte) americana	18,60%
DR9	Latino (Norte) americana	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets rusos	61%
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%

Alelo	Población	Fenotipo calculado a partir de la frecuencia de alelos
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Oeste de Australia	22%
A*24	EE.UU.	22%
A*24	Samara de Rusia	20%
A*24	Sudamérica	20%
A*24	Europa	18%

Gen MAGEA4

Este gen es un miembro de la familia de genes MAGEA. Los miembros de esta familia codifican para proteínas con entre 50 y 80% de identidad de secuencia entre sí. Los promotores y primeros exones de los genes MAGEA muestran variabilidad considerable, sugiriendo que la existencia de esta familia de genes permite que se exprese la misma función bajo diferentes controles transcripcionales. Los genes MAGEA están agrupados en la posición cromosómica Xq28. Han sido implicados en algunos trastornos hereditarios, tales como disqueratosis congénita. Para este gen se han encontrado por lo menos cuatro variantes que codifican para la misma proteína. (Provisto por RefSeq, Julio de 2008).

La localización de MAGEA4 se ha descrito como citoplasmática (Kim y col., 2015). Sin embargo, la tinción de MAGEA4 se ha detectado en los

núcleos, con distribución diferencial entre núcleo y citoplasma en cánceres bien diferenciados respecto a menos diferenciados (Sarcevic y *col.*, 2003).

El MAGEA4 se usa como un marcador de células germinales masculinas. No se expresa en gonocitos, pero se expresa en preespermatogonias y en células germinales maduras (Mitchell y *col.*, 2014).

Tabla 4: Blanco cancerígeno general

Propiedades del antígeno	Evaluación
Sobreexpresión en [cáncer de interés] informado en la literatura	
Sobreexpresión en otros cánceres informados en la literatura	+
Respuesta de células T contra blancos derivados de proteínas fuente descritos	+
Patrón de expresión oncofetal	+
Expresión por células madre cancerígenas	(-)
Roles en la progresión del ciclo celular y proliferación de la célula tumoral	(-)
Involucramiento en la invasión, migración y metástasis tumoral	
Vinculación a las vías de señalización asociadas a cáncer ¹	
Efectos antiapoptóticos	(-)
Efectos proangiogénicos / neovascularización	
Sobreexpresión vinculada a mal pronóstico en cáncer	+
Sobreexpresión asociada a estadios avanzados de cáncer	+
Blanco cancerígeno general	
Localización subcelular ²	CY

Propiedades del antígeno	Evaluación
Caracterización de proteína fuente en la literatura (-, +, ++, +++)	+
Asociación de tipo celular ³	TU

¹ TGF = factor de crecimiento transformante; PI3K = Fosfatidilinosítido 3-quinasa; p53 = antígeno tumoral celular p53; EGFR = receptor del factor de crecimiento epidérmico; FGF2 = factor de crecimiento de fibroblastos 2; Wnt = vía de Wnt / beta-catenina (embriogénesis); Ras = protooncogen de sarcoma de rata; NF-kB = factor nuclear Kappa B (factor de transcripción eucariótico) ² CY = citoplasmático; ³ TU = células tumorales

pMHC como blanco

Un ensayo clínico de fase I investigó la transferencia adoptiva CTL autólogos con diseño de TCR reactivos por MAGEA4(143-151) unido a HLA-A*24:02 en pacientes con cáncer esofágico. Los pacientes recibieron linfocitos traducidos con TCR una vez, sin tratamiento de precondicionamiento, seguido por inmunizaciones subcutáneas con el péptido MAGEA4 después de 2 y 4 semanas. No se observó regresión objetiva del tumor, posiblemente debido a la falta de régimen de depleción de linfocitos y administración de IL2 (Kageyama y *col.*, 2015). Los estudios preclínicos en ratones han demostrado que las células T transferidas inhibieron el crecimiento de líneas celulares tumorales que expresan MAGEA4 inoculadas en los ratones, y que la vacunación adicional con el péptido mejoró la actividad antitumoral (Shirakura y *col.*, 2012).

El direccionamiento a MAGEA4 con transferencia adoptiva de CTL es propuesto como una opción de tratamiento para linfoma de Hodgkin y no

Hodgkin negativos para EBV. Se ha descrito que los CTL infundidos dirigidos contra los péptidos derivados de EBV inducen remisiones completas en pacientes con linfoma EBV(+). Por lo tanto, el direccionamiento a otros antígenos expresados por el linfoma, incluyendo MAGEA4, está siendo explorado como una opción de tratamiento posible (Cruz y col., 2011; Gerdemann y col., 2011).

Varios estudios han demostrado la generación de células T CD4(+) específicas por MAGEA4 a partir de donantes sanos y pacientes con cáncer después de la incubación con células presentadoras de antígeno autólogas pulsadas con conjuntos de péptidos solapados (Cesson y col., 2011; Gerdemann y col., 2011; Ohkuri y col., 2009).

El péptido MAG-003, es decir, KVLEHVVRV (SEQ ID NO:1), es un epitope de MAGEA4 (aminoácidos 286-294) de linfocitos T citotóxicos (CTL) restringidos por HLA-A*0201. (Jia y col. 2010; Wu y col. 2011), cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. En un aspecto, el MAG-003 produce CTL específicos de péptido *in vitro* a partir de PBCM positivos para HLA-A*0201 y en ratones transgénicos para HLA-A*0201/Kb. En otro aspecto, los CTL inducidos lisan células blanco de un modo restringido a HLA-A*0201, demostrando que MAG-003 es un epitope de CTL restringido a HLA-A*0201 y que sirve como blanco para la vacunación antitumoral terapéutica (Jia y col. 2010), cuyo contenido se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

En la Figura 1 se muestra la presentación del péptido MAG-003 en tejidos sanos y en cánceres. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Específicamente, se estima aproximadamente entre 4.000 y 2.000 copias de

MAG-003 por célula en tejidos tumorales de cáncer de ovario (OC) y cáncer de pulmón a células no pequeñas (NSCLC), respectivamente.

Tabla 5: Presentación de MAG-003 en tejidos sanos y en cánceres.

A*02	Muestras	Intensidad promedio	Puntuación j
Sano	0 de 245	---	---
<u>Cáncer</u>	14 de 397	1,1e+07	0,000
<u>HCC</u>	1 de 16	2,9e+06	0,000
<u>MEL</u>	0 de 3	0,0e+00	
<u>OC</u>	2 de 20	4,0e+07	0,000
<u>pNSCLC</u>	11 de 91	1,0e+07	0,000

Perfiles de expresión de genes que codifican para los péptidos de la memoria descriptiva

La sobreexpresión o la presentación específica de los TAA en células tumorales en comparación con las células sanas es suficiente para su utilidad en la inmunoterapia, y algunos péptidos son específicos de tumor a pesar que su proteína fuente también aparece en tejidos sanos. Además, el perfil de expresión de ARNm agrega un nivel de seguridad adicional en la selección de los blancos peptídicos para inmunoterapias. Especialmente para las opciones terapéuticas con riesgos altos de seguridad, tal como TCR con maduración de afinidad, el péptido blanco ideal derivará de una proteína que es única para el tumor y que no se encuentra en tejidos sanos.

Fuentes de ARN y preparación

Se proveyeron muestras de tejido extraído quirúrgicamente como se indicó precedentemente después de haber obtenido de cada paciente el consentimiento informado. Las muestras de tejido tumoral se congelaron inmediatamente después de la cirugía y se homogeneizaron más tarde con mortero y pisón con nitrógeno líquido. Se preparó ARN total a partir de estas muestras usando el reactivo TRI (Ambion, Darmstadt, Alemania) seguido por limpieza con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Experimentos con RNAseq

El análisis de la expresión de genes de muestras de ARN de tejidos tumorales y sanos se realizó por secuenciación de alto rendimiento (RNAseq) por CeGaT (Tübingen, Alemania). Se prepararon bibliotecas de secuenciación usando el conjunto de componentes de reactivos Illumina HiSeq v4 de acuerdo con el protocolo del proveedor (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU.), el cual incluye fragmentación del ARN, conversión a ADNc y agregado de adaptadores de secuenciación. Las bibliotecas derivadas de muestras múltiples se mezclan de manera equimolar y se secuencian en el secuenciador Illumina HiSeq 2500 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, generando lecturas de extremos individuales de 50 pb. Las lecturas procesadas se mapean en el genoma humano (GRCh38) usando el programa de computación STAR. Los datos de expresión se proveen a nivel de transcripto como RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas, generado por el programa de computación Cufflinks) y a nivel de exón (lecturas totales, generadas por el programa de computación Bedtools), en base a anotaciones de la base de

datos de secuencias ensembl (Ensembl77). Las lecturas de exones se normalizan de acuerdo a la longitud del exón y al tamaño de alineamiento para obtener los valores de RPKM.

Como se muestra en las Figuras 2-4, el MAG-003 se expresa mucho en tejidos cancerosos y en tejidos sanos de bajo riesgo, tales como testículos, en comparación con los tejidos sanos de riesgo alto y de riesgo medio.

Las Tablas 6-8 muestran los datos de RNASeq (Puntuaciones de expresión) de la expresión de MAG-003 en diferentes cánceres

Tabla 6: Puntuación 1 de RNASeq

Tipo de tumor	Puntuación tg	Puntuación de exón (27242)	Puntuación de exón (317034)	Puntuación de exón (593984)
BRCA	1,57	1,23	1,23	1,51
CRC	1,65	1,00	1,00	1,76
HCC	12,10	11,98	11,97	6,15
OC	56,60	18,45	18,44	57,74
OSCAR	58,42	3,49	3,49	60,40
PC	12,10	10,78	10,77	4,74
pGB	0,88	0,95	0,95	0,74
pNSCLC	100,83	1,52	1,52	98,57
RCC	0,93	0,95	0,95	0,77
SCLC	56,41	28,32	28,30	152,27

Tabla 7: Puntuación 3 de RNASeq

Tipo de	Puntuación tg	Puntuación	Puntuación	Puntuación
----------------	----------------------	-------------------	-------------------	-------------------

tumor		de exón (27242)	de exón (317034)	de exón (593984)
BRCA	7,48	5,11	5,11	6,01
CRC	8,35	1,05	1,05	7,90
HCC	123,03	210,33	210,30	42,22
OC	612,59	333,74	333,69	447,29
OSCAR	632,95	47,41	47,40	468,45
PC	122,95	187,07	187,05	31,15
pGB	0,31	0,18	0,18	0,25
pNSCLC	1100,05	10,26	10,25	768,23
RCC	0,78	0,18	0,18	0,43
SCLC	611,00	524,23	524,17	1190,36

Tabla 8: Expresión del tumor

Tipo de tumor	Puntuación tg	Puntuación de exón (27242)	Puntuación de exón (317034)	Puntuación de exón (593984)
BRCA	0,12	0,04	0,04	0,17
CRC	0,14	0,01	0,01	0,22
HCC	2,05	1,82	1,82	1,18
OC	11,19	3,16	3,16	13,72
OSCAR	10,89	0,42	0,42	13,11
PC	2,09	1,65	1,65	0,89
pGB	0,00	0,00	0,00	0,01
pNSCLC	19,25	0,09	0,09	22,58

RCC	0,01	0,00	0,00	0,01
SCLC	10,18	4,53	4,53	33,35

En un aspecto, un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se indica en la presente puede tener uno o dos aminoácidos de no anclaje (véase más adelante respecto al motivo de anclaje) intercambiados sin que cambie sustancialmente o se afecte negativamente la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II, en comparación con el péptido no modificado. En otra forma de realización, en un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se indica en la presente, uno o dos aminoácidos pueden ser intercambiados por sus compañeros de intercambio conservativo (véase en la presente más adelante) sin que se cambie sustancialmente, o que se afecte negativamente, la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II, en comparación con el péptido no modificado.

Los residuos aminoacídicos que no contribuyen sustancialmente a interacciones con el TCR pueden modificarse por reemplazo por otros aminoácidos cuya incorporación no afecta sustancialmente la reactividad de la célula T y no elimina la unión al MHC relevante. Por lo tanto, además de la condición mencionada, el péptido de la memoria descriptiva puede ser cualquier péptido (término bajo el cual los inventores incluyen oligopéptido o polipéptido), que incluye las secuencias de aminoácidos o una porción o variante de las mismas como se describen.

Tabla 9: Variantes y motivos de los péptidos

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NOs:1-24	K	V	L	E	H	V	V	R	V
Variantes									L
									A
									I
		L							
		L							L
		L							A
		L							I
		A							
		A							L
		A							A
		A							I
	Y	L							
	Y	L							L
	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

Los péptidos más largos también pueden ser adecuados en un aspecto. Es posible que los epitopes de MHC de clase I, a pesar que usualmente el epitope real son residuos que no afectan sustancialmente el clivaje proteolítico necesario para exponer el epitope real durante el procesamiento.

En un aspecto, los péptidos de la memoria descriptiva pueden alargarse hasta 1, 2, 3, o 4 aminoácidos, es decir que puede agregarse 1, 2, 3 o 4 aminoácidos a cualquier extremo del péptido en cualquier combinación entre 8 y 11 aminoácidos de longitud. Se prefiere que los residuos que flanqueen entre 4:0 y 0:4. Las combinaciones de las elongaciones de acuerdo con la memoria descriptiva pueden encontrarse en la Tabla 10.

Tabla 10: Combinaciones de las elongaciones de péptidos de la memoria descriptiva

C-terminal	N-terminal
4	0
3	0 o 1
2	0 o 1 o 2
1	0 o 1 o 2 o 3
0	0 o 1 o 2 o 3 o 4
N-terminal	C-terminal
4	0
3	0 o 1
2	0 o 1 o 2
1	0 o 1 o 2 o 3
0	0 o 1 o 2 o 3 o 4

Los aminoácidos para la elongación/extensión pueden ser péptidos de la secuencia original de la proteína o cualquier otro u otros aminoácidos. La elongación puede usarse para mejorar la estabilidad o solubilidad de los péptidos.

Por lo tanto, los epitopes de la presente descripción pueden ser idénticos a los epitopes asociados a tumor o específicos de tumor de origen natural o pueden incluir epitopes que difieren en no más de cuatro residuos respecto al péptido de referencia, con la condición que tengan sustancialmente una actividad antigénica idéntica.

En una forma de realización alternativa, se alarga el péptido en uno o ambos lados en más de 4 aminoácidos, preferiblemente hasta una longitud total de hasta 30 aminoácidos. En un aspecto, esta elongación lleva a péptidos de unión a MHC de clase II. La unión a MHC de clase II puede ser evaluada mediante métodos conocidos en el arte.

Por consiguiente, la presente memoria descriptiva provee péptidos y variantes de epitopes de MHC de clase I, en donde el péptido o variante tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 14, por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos, en el caso de los péptidos de unión de clase II más largos, la longitud también puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos.

En un aspecto, el péptido o variante de acuerdo con la presente memoria descriptiva tendrá la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II. La unión de un péptido o una variante al complejo MHC se puede verificar mediante métodos conocidos en el arte.

Preferiblemente, cuando las células T específicas para un péptido de acuerdo con la presente memoria descriptiva se prueban contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la que los péptidos sustituidos consiguen la mitad del incremento máximo de la lisis en relación a un valor de fondo es de no más de aproximadamente 1 mM, preferiblemente no más de aproximadamente 1 μ M, más preferiblemente no más de aproximadamente 1 nM, y aún más preferiblemente no más de aproximadamente 100 pM, y más preferiblemente no más de aproximadamente 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por las células T de más de un individuo, por lo menos dos, y más preferiblemente tres individuos.

Tal como se usa en la presente, el término "complejo" se refiere a una molécula que se une específicamente a un determinante (por ejemplo, antigénico). En una forma de realización, un complejo es capaz de dirigir la entidad a la cual está unido (por ejemplo, una (segunda) porción de unión a antígeno) a un sitio blanco, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que porta el determinante antigénico (por ejemplo, el complejo de un péptido con MHC, de acuerdo con la aplicación requerida). En otra forma de realización un complejo es capaz de activar la señalización a través de su antígeno blanco, por ejemplo un antígeno de complejo de receptor de células T. Los complejos incluyen a título enunciativo no taxativo anticuerpos y fragmentos de los mismos, dominios de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprenden una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región variable de cadena liviana de anticuerpo, proteínas de unión que comprenden por lo menos un motivo de repetición de anquirina y moléculas de unión a antígeno de dominio individual (SDAB), aptámeros, TCR (solubles) y células

(modificadas) tales como células T alogeneicas o autólogas. Para evaluar si una molécula es un complejo que se une a un blanco, se pueden llevar a cabo ensayos de unión.

Unión “específica” significa que el complejo (por ejemplo el TCR) se une al complejo péptido-MHC de interés mejor que otros complejos péptido-MHC de origen natural, en una extensión en que un complejo provisto de una molécula activa que es capaz de matar una célula que porta el blanco específico no es capaz de matar a otra célula sin el blanco específico, pero que presenta otros complejos de péptido-MHC. La unión a otros complejos péptido-MHC es irrelevante si el péptido del péptido-MHC de reacción cruzada no es de origen natural, es decir, no deriva del peptidoma de HLA humano. Las pruebas para evaluar la muerte de células blanco son bien conocidas en el arte. Las mismas se deben llevar a cabo usando células blanco (células primarias o líneas celulares) con presentación inalterada de péptido-MHC, o células cargadas con péptidos de forma que se alcancen los niveles de péptido-MHC de origen natural.

Cada complejo puede comprender una marca que hace que el complejo unido se pueda detectar mediante la determinación de la presencia o ausencia de una señal provista por la marca. Por ejemplo, el complejo se puede marcar con un rótulo fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular aplicable. Dichas moléculas marcadoras son bien conocidas en el arte. Por ejemplo una marcación de fluorescencia, por ejemplo provista por un rótulo fluorescente, puede proveer una visualización del aptámero unido por microscopía de fluorescencia o barrido laser o citometría de flujo.

Cada complejo se puede conjugar con una segunda molécula activa tal como por ejemplo IL-21, anti-CD3, y anti-CD28.

Información adicional sobre complejos de polipéptidos se puede hallar, por ejemplo, en la sección de antecedentes de WO 2014/071978A1, que se incorpora a modo de referencia en su totalidad.

Una “composición farmacéutica” es una composición adecuada para su administración a un ser humano en un escenario médico. Preferiblemente, una composición farmacéutica es estéril y se produce de acuerdo con las guías de GMP.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también incluyen por lo menos un TCR, TCR soluble, ácido nucleico, y/o célula huésped que expresa un TCR de la presente descripción, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden incluir excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

Esta composición se usa para administración parenteral, tal como la administración subcutánea, intradérmica, intramuscular u oral. Para esto, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como soluciones amortiguadoras, agentes de unión, agentes de expansión, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Una extensa lista de excipientes que se pueden usar en dicha composición, puede tomarse, por ejemplo, de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). La composición se puede usar para prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades

adenomatosas o cancerosas. Los ejemplos de formulaciones pueden hallarse en, por ejemplo, EP2112253, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Un aspecto adicional de la memoria descriptiva provee ácidos nucleicos (por ejemplo polinucleótidos) que codifican para un péptido, variantes de péptido, TCR y variantes de TCR de la memoria descriptiva. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ANP, ARN o combinaciones de los mismos, ya sean de cadena individual y/o doble, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato, y los mismos pueden contener o no intrones, siempre y cuando el mismo codifique para el péptido. Por supuesto, solo los péptidos que contienen residuos aminoacídicos de origen natural unidos por enlaces peptídicos de origen natural son codificables por un polinucleótido. Aún otro aspecto de la memoria descriptiva provee un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con la memoria descriptiva.

Se han desarrollado una variedad de métodos para conectar polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores por ejemplo a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, se pueden agregar extensiones homopoliméricas complementarias al segmento de ADN a insertar en el ADN del vector. Los ADN del vector y del segmento se unen luego mediante uniones de hidrógeno entre las colas complementarias homopoliméricas para formar moléculas de ADN recombinante.

Los conectores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proveen un método alternativo de unión del segmento de ADN a los vectores. Hay disponibles comercialmente conectores sintéticos que contienen una

variedad de sitios para endonucleasa de restricción a partir de varias firmas, incluyendo a International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE.UU.

Un método deseable para modificar el ADN que codifica para el polipéptido de la memoria descriptiva emplea la reacción en cadena de la polimerasa como se divulga en Saiki RK, y *col.* (Saiki y *col.*, 1988). Este método se puede usar para introducir el ADN a un vector adecuado, por ejemplo por modificaciones en los sitios de restricción adecuados, o se puede usar para modificar el ADN de otras formas adecuadas conocidas en el arte. Si se usan vectores virales, se prefieren los vectores de virus pox o de adenovirus.

En un aspecto, para obtener células T que expresan los TCR de la presente descripción, se clonan ácidos nucleicos que codifican para cadenas alfa de TCR y/o beta de TCR de la presente descripción en vectores de expresión, tales como retrovirus gamma o lentivirus. Los virus recombinantes se generan y luego se prueban para ver su funcionalidad, tal como la especificidad de antígeno y la avidéz funcional. Luego se usa una alícuota del producto final para transducir la población de células T blanco (en general purificadas de PBMC de pacientes), las cuales se expanden antes de infundirse al paciente.

En otro aspecto, para obtener células T que expresan los TCR de la presente descripción, se sintetizan ARN de TCR por técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, sistemas de transcripción *in vitro*. Los ARN de TCR sintetizados *in vitro* se introducen luego en células T CD8+ primarias obtenidas de donantes sanos por electroporación para reexpresar las cadenas alfa de TCR y/o beta de TCR específicas de tumor.

Las cadenas de TCR introducidas en una célula T periférica pueden competir con las cadenas de TCR endógenas para asociarse con el complejo CD3, lo cual es necesario para la expresión en superficie de los TCR. Debido a que es esencial un alto nivel de expresión de TCR en superficie para conferir una sensibilidad apropiada para la activación por células que expresan el antígeno tumoral blanco (Cooper y *col.*, 2000; Labrecque y *col.*, 2001), las estrategias que aumentan los niveles de expresión de los genes de cadena alfa de TCR y beta de TCR son una consideración importante en la terapia génica con TCR.

Para incrementar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican para los TCR de la presente descripción se pueden conectar en forma operativa a promotores fuertes, tales como las repeticiones terminales largas retrovirales (LTR), de cytomegalovirus (CMV), de virus de células madres murinas (MSCV) U3, de fosfoglicerato quinasa (PGK), de β -actina, de ubiquitina, y un promotor compuesto de virus de simio 40 (SV40)/CD43 (Cooper y *col.*, 2004; Jones y *col.*, 2009), de factor de elongación (EF)-1a (Tsuji y *col.*, 2005) y el promotor del virus de formación de focos de bazo (SFFV) (Joseph y *col.*, 2008). En una forma de realización preferida, el promotor es heterólogo al ácido nucleico que se está expresando.

Además de los promotores fuertes, los casetes de expresión de TCR de la presente descripción pueden contener elementos adicionales que pueden aumentar la expresión del transgén, incluyendo un tracto central de polipurina (cPPT), que promueve la translocación nuclear de las construcciones lentivirales (Follenzi y *col.*, 2000), y el elemento regulatorio postranscripcional del virus de hepatitis de la marmota (wPRE), que incrementa el nivel de

expresión del transgén mediante el aumento de la estabilidad del ARN (Zufferey y *col.*, 1999).

Las cadenas alfa y beta de un TCR de la presente invención pueden estar codificadas por ácidos nucleicos localizados en vectores separados, o pueden estar codificadas por polinucleótidos localizados en el mismo vector.

Para conseguir un alto nivel de expresión superficial de TCR se requiere que tanto las cadenas alfa de TCR como beta de TCR de los TCR introducidos se transcriban a altos niveles. Para ello, las cadenas alfa de TCR y beta de TCR de la presente descripción se pueden clonar en construcciones bicistrónicas en un vector individual, que se ha demostrado que es capaz de superar este obstáculo. El uso de un sitio de entrada intrarribosomal viral (IRES) entre las cadenas alfa de TCR y beta de TCR resulta en la expresión coordinada de ambas cadenas, debido a que las cadenas alfa de TCR y beta de TCR se generan a partir de un transcripto individual que se escinde en dos proteínas durante la traducción, asegurando que se produzca una proporción molar equivalente de cadenas alfa de TCR y beta de TCR. (Schmitt y *col.* 2009).

Los ácidos nucleicos que codifican para los TCR de la presente descripción se pueden optimizar por uso de codones para incrementar la expresión a partir de una célula huésped. La redundancia del código genético permite que algunos aminoácidos estén codificados por más de un codón, pero ciertos codones son menos “óptimos” que otros, debido a disponibilidad relativa de ARNt coincidentes así como también por otros factores (Gustafsson y *col.*, 2004). Se ha demostrado que la modificación de las secuencias de las cadenas alfa de TCR y beta de TCR de forma de que cada aminoácido esté

codificado por el codón óptimo para expresión génica en mamífero, así como también la eliminación de los motivos de inestabilidad de ARNm o los sitios de maduración crípticos, aumenta significativamente la expresión de los genes de cadena alfa de TCR y beta de TCR (Scholten y *col.*, 2006).

Más aún, el mal apareamiento entre las cadenas de TCR introducidas y endógenas puede resultar en la adquisición de especificidades que significan un riesgo significativo de autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros de TCR mixtos puede reducir el número de moléculas de CD3 disponibles para formar complejos de TCR apareados apropiadamente, y por lo tanto puede reducir significativamente la avidez funcional de las células que expresan los TCR introducidos (Kuball y *col.*, 2007).

Para reducir el mal apareamiento, se puede modificar el dominio C-terminal de las cadenas de TCR introducidas de la presente descripción con el objetivo de promover una afinidad intercatenaria, mientras que se disminuye la capacidad de las cadenas introducidas para aparearse con los TCR endógenos. Estas estrategias pueden incluir reemplazar los dominios C-terminales de cadena alfa de TCR y beta de TCR humano por sus contrapartes murinas (dominio C-terminal murinizado); generar un segundo enlace disulfuro intercatenario en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína tanto en las cadenas alfa de TCR como beta de TCR de los TCR introducidos (modificación de cisteínas); intercambiar los residuos de interacción en los dominios C-terminales de cadena alfa de TCR y beta de TCR ("botón en hueco"); y fusionar los dominios variables de las cadenas alfa de TCR y beta de TCR directamente a CD3 ζ (fusión a CD3 ζ). (Schmitt y *col.* 2009).

El ADN (o en el caso de vectores retrovirales, ARN) se puede expresar entonces en un huésped adecuado para producir un polipéptido que comprende el péptido o variante de la memoria descriptiva. Por lo tanto, el ADN que codifica para el péptido o variante de la memoria descriptiva se puede usar de acuerdo con técnicas conocidas, apropiadamente modificadas en vista de los contenidos de la presente, para construir un vector de expresión, que luego se usa para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la memoria descriptiva. Dichas técnicas incluyen a las que se divulgan, por ejemplo, en US 4.440.859; 4.530.901; 4.582.800; 4.677.063; 4.678.751; 4.704.362; 4.710.463; 4.757.006; 4.766.075; y 4.810.648, que se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

El ADN (o en el caso de vectores retrovirales, el ARN) que codifica para el polipéptido que constituye el compuesto de la memoria descriptiva se puede asociar a una amplia variedad de otras secuencias de ADN para su introducción en un huésped apropiado. El ADN de compañía dependerá de la naturaleza del huésped, de la manera de introducir el ADN en el huésped, y de si se desea un mantenimiento episomal o una integración.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, con orientación apropiada y marco de lectura correcto para su expresión. Si fuese necesario, el ADN se puede conectar a secuencias nucleotídicas de control apropiadas reguladoras de transcripción y traducción reconocidas por el huésped deseado, a pesar de que dichos controles en general están disponibles en el vector de expresión. El vector se introduce luego en el huésped a través de técnicas estándares. En general, no todos los

huéspedes se transformarán con el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar a las células huéspedes transformadas. Una técnica de selección usa la incorporación en el vector de expresión de una secuencia de ADN, con los elementos de control necesarios, que codifica para un rasgo seleccionable en la célula transformada, tal como resistencia a antibiótico.

Como alternativa, el gen para dicho rasgo seleccionable puede ser otro vector, que se usa para cotransformar la célula huésped deseada.

Las células huéspedes que se han transformado con el ADN recombinante de la memoria descriptiva se cultivan entonces durante un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas conocidas para las personas con experiencia en el arte en vista de los contenidos divulgados en la presente para permitir la expresión del polipéptido, que luego se puede recuperar.

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus spec.*), células vegetales, células animales y células de insecto. Preferiblemente, el sistema puede ser de células de mamíferos tales como las células CHO disponibles de la ATCC Cell Biology Collection.

En una forma de realización, una célula huésped se modifica para expresar un TCR de la presente descripción. En formas de realización preferidas, la célula huésped es una célula T o progenitor de célula T humana. En algunas formas de realización la célula T o progenitor de célula T se obtiene a partir de un paciente con cáncer. En otras formas de realización la célula T o progenitor de célula T se obtiene a partir de un donante sano. Las células huéspedes de la presente descripción alogeneicas o autólogas con respecto al

paciente a tratar. En una forma de realización, el huésped es una célula T gamma/delta transformada para expresar un TCR alfa/beta.

Un vector plasmídico típico para expresión constitutiva en célula de mamífero comprende el promotor de CMV o SV40 con una cola poli A adecuada y un marcador de resistencia, tal como para neomicina. Un ejemplo es el pSVL disponible de Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de un vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también disponible de Pharmacia. Los vectores plasmídicos útiles de levadura son el pRS403-406 y el pRS413-416 y en general están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración en levadura (Ylps) e incorporan los marcadores de selección para levaduras HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycps). Los vectores basados en promotor de CMV (por ejemplo de Sigma-Aldrich) proveen una expresión transitoria o estable, expresión citoplasmática o secreción, y marcado N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, purificación y análisis de proteínas recombinantes. Las fusiones doblemente marcadas proveen flexibilidad para la detección.

La región reguladora del promotor de citomegalovirus humano (CMV) fuerte produce niveles de expresión constitutiva de proteína tan altos como 1 mg/L en células COS. Para las líneas celulares menos potentes, los niveles de proteína son típicamente ~0,1 mg/L. La presencia del origen de replicación de SV40 resultará en altos niveles de replicación de ADN en células COS que permiten la replicación de SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden

contener el origen pMB1 (derivado de pBR322) para replicación en células bacterianas, el gen de b-lactamasa para selección mediante resistencia a ampicilina en bacterias, la poliA de hGH, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de pre-pro-tripsina (PPT) pueden dirigir la secreción de proteínas de fusión con FLAG hacia el medio de cultivo para su purificación usando anticuerpos, resinas, y placas ANTI-FLAG. Otros vectores y sistemas de expresión son bien conocidos en el arte para usar con una variedad de células huéspedes.

En otra forma de realización dos o más péptidos o variantes de péptido de la memoria descriptiva están codificados y por lo tanto expresados en un orden sucesivo (construcciones similares a “perlas de un collar”). Haciéndolo así, los péptidos o variantes de péptido se pueden conectar o fusionar juntos mediante sucesiones de aminoácidos conectores, tales como por ejemplo LLLLLL, o se pueden conectar sin ningún péptido adicional entre ellos. Estas construcciones también se pueden usar para terapia contra cáncer, y pueden inducir respuestas inmunológicas que involucran tanto MHC I como MHC II.

La presente memoria descriptiva también se relaciona con una célula huésped transformada con una construcción de vector polinucleotídico de la presente descripción. La célula huésped puede ser procariota o bien eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células huéspedes procariotas preferidas en algunos casos, y típicamente son una cepa de *E. coli* tal como, por ejemplo, las cepas de *E. coli* DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU. (No de ATCC 31343). Las células huéspedes eucariotas preferidas incluyen a células de

levadura, insecto y de mamíferos, preferiblemente células de vertebrados tales como las de una línea celular de fibroblasto o de colon de ratón, rata, mono o humano. Las células huéspedes de levadura incluyen a YPH499, YPH500 y YPH501, que en general están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células huéspedes de mamífero preferidas incluyen a las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en ATCC como CCL61, las células de embrión de ratón NIH Swiss NIH/3T3 disponibles de ATCC como CRL 1658, las células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles de ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células de riñón de embrión humano. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión derivados de baculovirus. Una visión global con respecto a las células huéspedes adecuadas para expresión se puede hallar en, por ejemplo, el libro de texto de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", Parte Uno, Segunda Edición, ISBN 978-1-58829-262-9, y en otra literatura conocida por las personas con experiencia en el arte.

La transformación de los huéspedes celulares apropiados con una construcción de ADN de la presente descripción se lleva a cabo por métodos bien conocidos que típicamente dependen del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de células huéspedes procariotas, véase, por ejemplo, Cohen y *col.* (Cohen y *col.*, 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y *col.* (Sherman y *col.*, 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también es útil. Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles para transfectar dichas células, por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano o formulaciones de liposomas,

están disponibles en Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es conocida en el arte para transformar células de levadura, células bacterianas, células de insecto y células de vertebrados.

Las células exitosamente transformadas, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente descripción, se pueden identificar por técnicas bien conocidas tales como PCR. Como alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante se puede detectar usando anticuerpos.

Ha de apreciarse que ciertas células huéspedes de la memoria descriptiva son útiles en la preparación de los péptidos de la memoria descriptiva, por ejemplo células de bacteria, levadura e insecto. Sin embargo, otras células huéspedes pueden ser útiles en ciertos métodos terapéuticos. Por ejemplo, las células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas, pueden ser útiles para usar en la expresión de los péptidos de la memoria descriptiva de forma que los mismos se pueden cargar en moléculas de MHC apropiadas. Por lo tanto, esta descripción provee una célula huésped que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la memoria descriptiva.

En una forma de realización preferida la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) fueron aprobadas por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) el 29 de abril de 2010, para

tratar HRPC (Sipuleucel-T) metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Rini y *col.*, 2006; Small y *col.*, 2006).

Un aspecto adicional de la memoria descriptiva provee un método para producir un péptido o su variante, en donde el método comprende cultivar una célula huésped y aislar el péptido de la célula huésped o de su medio de cultivo.

En otra forma de realización los TCR, el ácido nucleico o el vector de expresión de la memoria descriptiva se usan en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante se pueden preparar para inyección intravenosa (i.v.), inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica (i.d.), inyección intraperitoneal (i.p.) o inyección intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos de inyección de péptidos incluyen s.c., i.d., i.p., i.m., e i.v. Los métodos preferidos de inyección de ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Se pueden administrar dosis de por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente entre 125 µg y 500 µg, de péptido o de ADN, y las mismas dependerán del péptido o ADN respectivo. Las dosificaciones de este rango se usaron exitosamente en ensayos previos (Walter y *col.*, 2012).

El polinucleótido que se usa para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o puede estar contenido en un vector o sistema de administración adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, ANP, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir dicho ácido nucleico son bien conocidos en el arte. Una discusión global se provee en por ejemplo, Teufel y *col.* (Teufel y *col.*, 2005). Las vacunas de polinucleótido son fáciles de preparar, pero el modo de acción de estos vectores para inducir una respuesta inmunológica aún no se comprende

completamente. Los vectores y sistemas de administración adecuados incluyen a ADN y/o ARN viral, tales como los sistemas basados en adenovirus, virus de vaccinia, retrovirus, herpes virus, virus adenoasociados o híbridos que contienen elementos de más de un virus. Los sistemas de administración no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos y los mismos son bien conocidos en el arte de la administración de ADN. También se puede usar una administración física, tal como a través de “pistola génica”. El péptido o los péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítopo que estimula a las células T para las respectivas CDR opuestas, como se indicó anteriormente.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con aptámeros. Los aptámeros (véase por ejemplo WO 2014/191359 y la literatura que se cita la presente que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad) son moléculas de ácido nucleico cortas de simple cadena, que se pueden plegar en estructuras tridimensionales definidas y pueden reconocer estructuras específicas de blanco. Se ha visto que los mismos son alternativas apropiadas para desarrollar terapias dirigidas. Se ha demostrado que los aptámeros se unen selectivamente a una variedad de blancos complejos con una alta afinidad y especificidad.

Se han identificado aptámeros que reconocen moléculas localizadas en la superficie celular en la década pasada y los mismos proveen medios para desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas. Debido a que se ha demostrado que los aptámeros casi no poseen toxicidad e inmunogenicidad, los mismos son candidatos promisorios para aplicaciones biomédicas. De hecho los aptámeros, por ejemplo los aptámeros que reconocen al antígeno de

membrana específico de próstata, se han empleado en forma exitosa para terapias dirigidas y se demostró que son funcionales en modelos de xenoinjerto *in vivo*. Más aún, se han identificado aptámeros que reconocen líneas celulares tumorales específicas.

Se pueden seleccionar aptámeros de ADN para revelar un amplio espectro de propiedades de reconocimiento para distintas células cancerosas, y particularmente las derivadas de tumores sólidos, mientras que las células no tumorigénicas y sanas primarias no son reconocidas. Si los aptámeros identificados reconocen no solo a un subtipo tumoral específico, sino que interaccionan con una serie de tumores, esto hace que los aptámeros sean aplicables como agentes de diagnóstico y terapéutica de amplio espectro.

Además, la investigación del comportamiento de unión a célula por citometría de flujo demostró que los aptámeros exhiben afinidades aparentes muy buenas que están dentro del rango nanomolar.

Los aptámeros son útiles para propósitos diagnósticos y terapéuticos. En un aspecto, por lo menos uno o más aptámeros son captados por las células tumorales y así pueden funcionar como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes anticancerosos tales como ARNic a las células tumorales.

Los aptámeros se pueden seleccionar contra blancos complejos tales como células y tejidos y complejos de los péptidos o los TCR que comprenden, o preferiblemente consisten en, una secuencia de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO 25 a SEQ ID NO 26, de acuerdo con la memoria descriptiva en mano con la molécula de MHC, usando la técnica de *Cell-SELEX* (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial).

En una forma de realización la descripción provee un método para producir un TCR como se describe en la presente, en donde el método comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar el TCR bajo condiciones adecuadas para promover la expresión del TCR.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde dicho método comprende incubar PBMC de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/MAG-003, incubar las PBMC con tetrámero-ficoeritrina (PE) y aislar las células T de alta avidéz por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)—Calibur.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde dicho método comprende incubar PBMC de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/p286-1Y2L, incubar las PBMC con tetrámero-ficoeritrina (PE) y aislar las células T de alta avidéz por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)—Calibur.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde dicho método comprende incubar PBMC de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/p286-1Y2L9L, incubar las PBMC con tetrámero-ficoeritrina (PE) y aislar las células T de alta avidéz por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)—Calibur.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde dicho método comprende obtener un ratón transgénico

con los loci génicos completos de TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyas células T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensa la deficiencia de TCR de los ratones, inmunizar el ratón con MAG-003, incubar los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámero-ficoeritrina (PE), y aislar las células T de alta avidéz por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde dicho método comprende obtener un ratón transgénico con los loci génicos completos de TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyas células T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensa la deficiencia de TCR de los ratones, inmunizar el ratón con p286-1Y2L, incubar los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámero-ficoeritrina (PE), y aislar las células T de alta avidéz por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para identificar y aislar un TCR de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde dicho método comprende obtener un ratón transgénico con los loci génicos completos de TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyas células T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensan la deficiencia de TCR de los ratones, inmunizar el ratón con p286-1Y2L9L, incubar los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámero-ficoeritrina (PE), y aislar las células T de alta avidéz por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con el método de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde la célula T comprende un vector de expresión que es capaz de expresar un TCR de acuerdo con la presente memoria descriptiva.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para matar células blanco en un paciente, en donde las células blanco expresan en forma aberrante MAG-003, en donde el método comprende administrar al paciente un número eficaz de TCR, TCR solubles y/o células T de acuerdo con la presente memoria descriptiva.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con el uso de cualquier TCR, ácido nucleico de acuerdo con la presente memoria descriptiva, vector de expresión de acuerdo con la presente memoria descriptiva, célula de acuerdo con la presente memoria descriptiva o un linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la presente memoria descriptiva como medicamento o en la elaboración de un medicamento. La presente memoria descriptiva se relaciona además con un uso de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en donde el medicamento es activo contra cáncer.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un uso de acuerdo con la memoria descriptiva, en donde dichas células cancerosas son células de cáncer de pulmón a células no pequeñas o células de otros tumores sólidos o hematológicos tales como cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de

células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con un método para matar células cancerosas que comprende poner en contacto las células cancerosas con una célula huésped de la presente descripción. En una forma de realización, la célula huésped expresa un TCR de la presente descripción. En una forma de realización la célula huésped es una célula T o un progenitor de célula T. En una forma de realización preferida las células cancerosas se seleccionan de células de cáncer de pulmón a células no pequeñas o células de otros tumores sólidos o hematológicos tales como cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico. En algunas formas de realización, el TCR se conjuga a un agente terapéuticamente activo. En determinadas formas de realización el agente terapéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un agente quimioterapéutico, y una toxina.

La presente invención se relaciona además con un método para tratar cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una célula huésped de la presente invención. En una forma de realización, la célula huésped expresa un TCR de la presente descripción. En una forma de realización la célula huésped es una célula T o progenitor de célula T. En una forma de realización la célula huésped es autóloga al sujeto a ser tratado. En

otra forma de realización la célula huésped es alogeneica al sujeto a ser tratado. En una forma de realización preferida las células cancerosas se seleccionan de células de cáncer de pulmón a células no pequeñas u otra célula de tumor hematológico o sólido tal como cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar y cáncer esofágico.

En algunas formas de realización, el TCR se conjuga a un agente terapéuticamente activo. Tal como se usa en la presente, el término “agente terapéuticamente activo” designa a un compuesto que se usa para tratar o prevenir una enfermedad o medical condición médica no deseable. En una forma de realización, el agente terapéuticamente activo se usa para tratar o prevenir cáncer. En determinadas formas de realización el agente terapéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un agente quimioterapéutico, y una toxina.

Los TCR, los ácidos nucleicos y las células huéspedes de la presente descripción, y las composiciones farmacéuticas de los mismos, se pueden administrar a un sujeto que lo necesite por rutas conocidas en el arte, y pueden variar dependiendo del tipo de cáncer a tratar. Las rutas de administración incluyen, por ejemplo, administración local (tal como intratumoral) y administración parenteral tal como subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intraportal e intrahepática. En una forma de realización preferida, los TCR, los ácidos nucleicos o las células huéspedes de la presente

descripción, o las composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran a un sujeto por infusión local, por ejemplo usando una bomba de infusión y/o sistema de catéter, a un sitio a tratar, tal como un tumor sólido. En una forma de realización, una composición de la presente descripción se infunde a un tumor sólido, un vaso sanguíneo que alimenta a un tumor sólido, y/o al área que rodea a un tumor sólido.

En formas de realización preferidas, las composiciones de la presente descripción se administran a un sujeto usando un régimen de dosificación de por lo menos dos administraciones separadas por al menos 24 horas. Los regímenes de dosificación adecuados para administrar composiciones de la presente descripción incluyen, por ejemplo, una vez por día, una vez cada dos días, y una vez cada tres días. Los regímenes de dosificación más preferidos incluyen una vez por semana, dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez por mes, y dos veces por mes. En formas de realización particulares, se usa un régimen de escalado de dosis, en donde se administra una serie de dosis crecientes a un sujeto a lo largo de un periodo de días, semanas o meses.

Las dosis eficaces de células huéspedes que expresan TCR de la presente invención incluyen, por ejemplo por lo menos aproximadamente 10^4 , por lo menos aproximadamente 10^5 , por lo menos aproximadamente 10^6 , por lo menos aproximadamente 10^7 , por lo menos aproximadamente 10^8 , por lo menos aproximadamente 10^9 , y por lo menos 10^{10} células huéspedes por dosis. En una forma de realización, las células huéspedes de la presente descripción se administran en una dosis de entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{10} células por dosis, preferiblemente en una dosis de entre

aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^9 células por dosis. En formas de realización preferidas, las dosis se administran en un régimen de dosificación durante el curso de por lo menos dos o más ciclos de dosificación.

La presente invención también se relaciona con un método para tratar cáncer que comprende administrar un TCR, un ácido nucleico, o una célula huésped de la presente descripción en combinación con por lo menos un agente terapéutico y/o terapia de radiación.

También se provee un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende:

- a) aislar una célula de dicho sujeto;
- b) transformar la célula con por lo menos un vector que codifica para un TCR de la presente descripción para producir una célula transformada;
- c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) administrar la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se provee un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende:

- a) aislar una célula de un donante sano;
- b) transformar la célula con un vector que codifica para un TCR de la presente descripción para producir una célula transformada;
- c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) administrar la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se provee un método para detectar cáncer en una muestra biológica que comprende:

a) poner en contacto la muestra biológica con un TCR de la presente descripción;

b) detectar la unión del TCR a la muestra biológica.

En algunas formas de realización el método para detectar cáncer se lleva a cabo *in vitro*, *in vivo* o *in situ*.

La presente memoria descriptiva se relaciona además con proteínas marcadoras particulares y biomarcadores basados en los péptidos de acuerdo con la presente memoria descriptiva, en la presente llamados “blancos” que se pueden usar en el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de pulmón a células no pequeñas. La presente memoria descriptiva también se relaciona con el uso de estos nuevos blancos para el tratamiento de cáncer.

Es un aspecto adicional de la memoria descriptiva proveer un método para producir un receptor soluble de células T (sTCR) que reconoce un complejo específico péptido-MHC. Dichos receptores solubles de células T se pueden generar a partir de clones específicos de células T, y se puede incrementar su afinidad por mutagénesis contra las regiones determinantes de complementariedad. Para el propósito de la selección de receptores de células T, se puede usar presentación en fagos (US 2010/0113300, (Liddy y col., 2012)). Para el propósito de la estabilización de los receptores de células T durante la presentación en fagos y en el caso de su uso práctico como fármaco, la cadena alfa y beta se pueden conectar por ejemplo, por enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de células T de cadena individual), o por dominios de dimerización (Boulter y col., 2003; Card y col., 2004; Willcox y col., 1999). El receptor de células T se puede conectar a toxinas, fármacos, citoquinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191),

dominios de reclutamiento de células efectoras tales como un dominio anti-CD3, etc., con el objetivo de ejecutar funciones particulares sobre las células blanco. En otro aspecto, el mismo se expresa en células T usadas para transferencia adoptiva. Véase, por ejemplo, WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1, y WO 2013/057586A1, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad a modo de referencia.

Además, los péptidos y/o los TCR o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente descripción se pueden usar para verificar el diagnóstico de un patólogo de un cáncer en base a una muestra de biopsia.

Los anticuerpos o TCR también se pueden usar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. En general, el anticuerpo o TCR se marca con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de forma que el tumor se puede localizar usando inmunocentellografía. En una forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más blancos de una proteína seleccionada del grupo que consiste en las proteínas que se mencionaron previamente, y el valor de afinidad (K_d) es menos de $1 \times 10^{-6}\text{M}$.

Los anticuerpos o TCR para uso diagnóstico se pueden marcar con sondas adecuadas para detección mediante diversos métodos de adquisición de imágenes. Los métodos para la detección de sondas incluyen, a título enunciativo no taxativo, microscopía de fluorescencia, óptica, confocal y electrónica; imágenes por resonancia magnética nuclear y espectroscopía; fluoroscopia, tomografía computada y tomografía de emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, a título enunciativo no taxativo, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros

lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Estos anticuerpos y/o TCR se pueden marcar directa o indirectamente con dichas sondas. La unión de las sondas a los anticuerpos y/o TCR incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda al anticuerpo o TCR, y la unión covalente de un compuesto quelante para su unión a la sonda, entre otros métodos bien reconocidos en el arte. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido enfermo puede ser fresca o congelada o puede estar embebida en parafina y fijada con un conservante tal como formalina. La sección fijada o embebida que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, en donde el anticuerpo se usa para detectar la expresión de las proteínas *in situ*.

La invención además se relaciona con los siguientes ítems:

Ítem 1. Un TCR que comprende una cadena alfa y una cadena beta, en donde la cadena alfa comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR por lo menos 90% idéntico a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:71; y la cadena beta comprende un dominio variable de cadena beta de TCR por lo menos 90% idéntico a cualquiera de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79, y en donde el TCR se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula MHC.

Ítem 2. El TCR del ítem 1, que además comprende un dominio constante de cadena alfa de TCR y un dominio constante de cadena beta de TCR, en donde el dominio constante de cadena alfa de TCR es por lo

menos 70% idéntico a un dominio constante de cadena alfa de TCR de cualquiera de SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:71, y el dominio constante de cadena beta es por lo menos 70% idéntico a un dominio constante de cadena beta de TCR de cualquiera de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79.

Ítem 3. El TCR de cualquiera de los ítems 1 o 2, en donde el dominio constante de cadena alfa comprende el dominio transmembrana alfa VIGFRILLKLVAGFNLLMTL (SEQ ID NO:97) y el dominio constante de cadena beta comprende el dominio transmembrana beta TILYEILLGKATLYAVLVSAVL (SEQ ID NO:88).

Ítem 4. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 3, en donde el dominio variable de cadena alfa de TCR consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39; y el dominio variable de cadena beta de TCR consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47.

Ítem 5. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 3, en donde el dominio variable de cadena alfa de TCR consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:55; y el dominio variable de cadena beta de TCR consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63.

Ítem 6. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 3, en donde el dominio variable de cadena alfa de TCR consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71; y el dominio variable de cadena beta de TCR consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79.

Ítem 7. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 6, en donde el dominio constante de cadena alfa de TCR consiste en el dominio constante de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:39, y el dominio constante de cadena beta

de TCR consiste en el dominio constante de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:47.

Ítem 8. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 6, en donde el dominio constante de cadena alfa de TCR consiste en el dominio constante de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:55, y el dominio constante de cadena beta de TCR consiste en el dominio constante de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:63.

Ítem 9. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 6, en donde el dominio constante de cadena alfa de TCR consiste en el dominio constante de cadena alfa de TCR de SEQ ID NO:71, y el dominio constante de cadena beta de TCR consiste en el dominio constante de cadena beta de TCR de SEQ ID NO:79.

Ítem 10. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 9, que comprende una cadena alfa que consiste en SEQ ID NO:39 y una cadena beta que consiste en SEQ ID NO:47.

Ítem 11. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 9, que comprende una cadena alfa que consiste en SEQ ID NO:55 y una cadena beta que consiste en SEQ ID NO:63.

Ítem 12. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 9, que comprende una cadena alfa que consiste en SEQ ID NO:71 y una cadena beta que consiste en SEQ ID NO:79.

Ítem 13. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 12, en donde la cadena alfa de TCR comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa que se selecciona del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:39, SEQ

ID NO:55 y SEQ ID NO:71; y/o la cadena beta de TCR comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena beta que se selecciona del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79.

Ítem 14. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 13, en donde la cadena alfa de TCR comprende las tres CDR de SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 o SEQ ID NO:71.

Ítem 15. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 13, en donde la cadena beta de TCR comprende las tres CDR de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 o SEQ ID NO:79.

Ítem 16. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 15, en donde la cadena alfa y la cadena beta se fusionan para formar un TCR de cadena individual.

Ítem 17. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 16, en donde la cadena alfa y/o beta comprende una marca detectable.

Ítem 18. El TCR del ítem 17, en donde la marca detectable se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un fluoróforo y biotina.

Ítem 19. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 18, en donde la cadena alfa y/o beta se conjuga a un agente terapéuticamente activo.

Ítem 20. El TCR del ítem 19, en donde el agente terapéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un agente quimioterapéutico y una toxina.

Ítem 21. Un TCR que comprende una cadena gamma y una cadena delta, en donde la cadena gama comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se selecciona del grupo que

consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:71; y/o la cadena delta de TCR comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) que se selecciona del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79, y en donde el TCR se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula MHC.

Ítem 22. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 21, en donde el TCR se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula MHC, en donde el péptido MAG-003 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs:1-24, y la molécula MHC es una molécula HLA de clase I o HLA de clase II.

Ítem 23. Un ácido nucleico que codifica para la cadena alfa y/o cadena beta del TCR de cualquiera de los ítems 1 a 20, o la cadena gama y/o la cadena delta del TCR del ítem 21.

Ítem 24. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico del ítem 23 conectado en forma operativa a por lo menos una secuencia promotora.

Ítem 25. Una célula huésped transformada con el vector de expresión del ítem 24.

Ítem 26. La célula huésped del ítem 25 que es una célula T o progenitor de célula T.

Ítem 27. La célula huésped del ítem 26 en donde la célula T o progenitor de célula T se obtiene a partir de un paciente con cáncer.

Ítem 28. La célula huésped del ítem 26 en donde la célula T o progenitor de célula T se obtiene a partir de un donante sano.

Ítem 29. Una composición farmacéutica que comprende el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, un ácido nucleico del ítem 23, un vector de expresión del ítem 24, y/o una célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

Ítem 30. Un método para producir un TCR que se une específicamente al péptido de SEQ ID NO:1 cuando es presentado por una molécula de MHC, en donde dicho método comprende cultivar la célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28 bajo condiciones adecuadas para promover la expresión del TCR.

Ítem 31. Un método para tratar cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesite el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, el ácido nucleico del ítem 23, el vector de expresión del ítem 24, la célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28, y/o la composición farmacéutica del ítem 29.

Ítem 32. El método del ítem 31, en donde el TCR se expresa sobre la superficie de una célula huésped.

Ítem 33. El método del ítem 31, en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en una célula T o progenitor de célula T.

Ítem 34. El método del ítem 33, en donde la célula T o progenitor de célula T es autólogo.

Ítem 35. El método del ítem 33, en donde la célula T o progenitor de célula T es alogeneica.

Ítem 36. El método del ítem 31, en donde el TCR se conjuga a un agente terapéuticamente activo.

Ítem 37. El método del ítem 36, en donde el agente terapéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un agente quimioterapéutico y una toxina.

Ítem 38. El método de cualquiera de los ítems 31 a 37, en donde el cáncer es cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar, cáncer esofágico, o una combinación de los mismos.

Ítem 39. El método de cualquiera de los ítems 31 a 38, que además comprende administrar al sujeto por lo menos un agente terapéutico.

Ítem 40. El método de cualquiera de los ítems 31 a 39, que además comprende administrar terapia de radiación al sujeto.

Ítem 41. Un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende:

- a) aislar una célula de dicho sujeto;
- b) transformar la célula con un vector que codifica para el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22 para producir una célula transformada;
- c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) administrar la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

Ítem 42. El método del ítem 41, en donde la célula se selecciona de una célula T o un progenitor de célula T.

Ítem 43. Un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende:

- a) aislar una célula de un donante sano;
- b) transformar la célula con un vector que codifica para el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22 para producir una célula transformada;
- c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) administrar la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

Ítem 44. El método del ítem 43, en donde la célula se selecciona de una célula T o un progenitor de célula T.

Ítem 45. Un método para detectar cáncer en una muestra biológica que comprende:

- a) poner en contacto la muestra biológica con el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, y
- b) detectar la unión del TCR a la muestra biológica.

Ítem 46. El método del ítem 45, en donde el TCR comprende una marca detectable.

Ítem 47. El método del ítem 46, en donde la marca detectable se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, un fluoróforo y biotina.

Ítem 48. El método de cualquiera de los ítems 45 a 47, en donde dicha detección se lleva a cabo *in vitro*, *in vivo* o *in situ*.

Ítem 49. El método de cualquiera de los ítems 45 a 48, en donde dicho cáncer es cáncer de pulmón a células no pequeñas, cáncer de pulmón a células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer

de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino, cáncer de vesícula biliar y de ducto biliar, cáncer esofágico, o una combinación de los mismos.

Ítem 50. La célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28 en donde la célula T es una célula T gamma/delta.

Ítem 51. Un método para matar células blanco en un paciente en donde las células blanco expresan en forma aberrante MAG-003, en donde el método comprende administrar al paciente un número eficaz de células T que expresan un TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, el ácido nucleico del ítem 23, el vector de expresión del ítem 24, la célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28, y/o la composición farmacéutica del ítem 29.

Ítem 52. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22 que es un TCR soluble.

Ítem 53. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, en donde la cadena alfa comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR por lo menos 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:71; y la cadena beta comprende un dominio variable de cadena beta de TCR por lo menos 95% idéntico a cualquiera de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79, y en donde el TCR se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula MHC.

Ítem 54. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22 que tiene por lo menos una mutación en la cadena alfa en relación a la SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 o SEQ ID NO:71 y/o que tiene por lo menos una mutación en la cadena

beta en relación a la SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79, y en donde el TCR tiene una afinidad de unión, y/o una vida media de unión por un complejo de péptido MAG-003-molécula HLA, que es por lo menos el doble que la del TCR no mutado para el mismo péptido.

Ítem 55. El TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22 que tiene por lo menos una mutación en la cadena alfa en relación a la SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 o SEQ ID NO:71 y/o que tiene por lo menos una mutación en la cadena beta en relación a la SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79, y en donde el TCR tiene una glicosilación modificada en comparación con el TCR no mutado.

Ítem 56. El método de cualquiera de los ítems 31 a 44 o 51, en donde el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, el ácido nucleico del ítem 23, el vector de expresión del ítem 24, la célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28 o la composición farmacéutica del ítem 29 se administra en por lo menos dos administraciones separadas por al menos 24 horas.

Ítem 57. El método del ítem 56, en donde el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, el ácido nucleico del ítem 23, el vector de expresión del ítem 24, la célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28 o la composición farmacéutica del ítem 29 se administra al sujeto a lo largo de un periodo de días, semanas o meses.

Ítem 58. El método de los ítems 56 o 57, en donde el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, el ácido nucleico del ítem 23, el vector de expresión del ítem 24, la célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28 o la composición farmacéutica del ítem 29 se administra por infusión local.

Ítem 59. El método del ítem 58, en donde la infusión local se administra mediante una bomba de infusión y/o un sistema de catéter.

Ítem 60. El método de los ítems 58 o 59, en donde dicha infusión local es en un tumor sólido, un vaso sanguíneo que alimenta a un tumor sólido, y/o el área que rodea a un tumor sólido.

Ítem 61. El método de cualquiera de los ítems 31 a 44, 51 o 56 a 60, en donde el TCR de cualquiera de los ítems 1 a 22, el ácido nucleico del ítem 23, el vector de expresión del ítem 24, la célula huésped de cualquiera de los ítems 25 a 28 o la composición farmacéutica del ítem 29 se administra en una dosis de entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{10} células por dosis.

Ítem 62. Un TCR que comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa que se selecciona del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena alfa de SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:71; y/o por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de cadena beta que se selecciona del grupo que consiste en una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta de SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:63 y SEQ ID NO:79, y en donde el TCR se une específicamente a un complejo de péptido MAG-003-molécula MHC.

EJEMPLOS

Se pueden hacer configuraciones aloreactivas para evitar la autotolerancia y dar células T con una mayor avidéz en comparación con las células T derivadas de configuraciones autólogas, es decir, pacientes. Los ejemplos de dichas configuraciones incluyen la generación *in vitro* de células T específicas de péptido reactivas a alo-HLA (Sadovnikova y col. 1998; Savage y

col. 2004; Wilde y col. 2012), e inmunización de ratones transgénicos para MHC humano o TCR humano (Stanislawski y col. 2001; Li y col. 2010).

Ejemplo 1: generación *in vitro* de células T específicas de péptido reactivas a alo-HLA (Savage y col. 2004)

Se usaron PBMC de donantes sanos positivos para HLA-A*02 y negativos para HLA-A*02 después de obtener el consentimiento informado. Se obtuvieron monómeros de HLA-A2 de clase I recombinantes biotinilados y tetrámeros fluorescentes de A2 que contienen MAG-003 a partir de MBLI (Woburn, MA). Se incubaron las PBMC con anti-CD20SA diluido en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron, y se incubaron con los monómeros de A2/MAG-003 biotinilados durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron, y se plaquearon a 3×10^6 células/pocillo en placas de 24 pocillos en RPMI con 10% de suero AB humano. Se agregó interleuquina 7 (IL-7; R&D Systems, Minneapolis, MN) en el día 1 a 10 ng/mL y se agregó IL-2 (Chiron, Harefield, Reino Unido) a 10 U/mL en el día 4. Se reestimularon las células a lo largo de un periodo de 5 semanas en forma semanal con PBMC nuevas, se mezclaron con células respondedoras a una proporción 1:1, y se plaquearon a 3×10^6 /pocillo en placas de 24 pocillos.

Para obtener células T de alta avidéz, se incubaron aproximadamente 10^6 PBMC con tetrámero de HLA-A2/MAG-003-ficoeritrina (PE) (obtenido de MBLI) durante 30 minutos a 37°C, seguido por anti-CD8-isocianato de fluoresceína (FITC)/aloficocianina (APC) durante 20 minutos a 4°C, seguido por análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS)–Calibur. La selección se hizo con un FACS-Vantage (Becton Dickinson, Cowley, Oxford,

Reino Unido). Las células seleccionadas positivas para el tetrámero se expandieron en placas de 24 pocillos usando, por pocillo, 2×10^5 células seleccionadas, 2×10^6 PBMC negativos para A2 irradiados como alimentadores, 2×10^4 CD3/CD28 esferas/mL (Dynal, Oslo Norway), e IL-2 (1000 U/mL). Las células T de alta avidéz obtenidas de ese modo se usaron luego para identificar y aislar TCR usando técnicas conocidas en el arte, tales como 5' RACE de célula individual (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc). Se analizaron luego los ADN de TCR no redundantes para determinación de secuencias de aminoácido/ADN y clonado en vectores de expresión usando métodos bien conocidos en el arte.

Ejemplo 2: Inmunización de ratones transgénicos para MHC humana o TCR humano

Se usó MAG-003 para inmunizar ratones transgénicos con los loci génicos completos de TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyas células T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensa la deficiencia de TCR de los ratones. (Li y col. 2010). Para obtener células T de alta avidéz, se incuban los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámero-ficoeritrina (PE) seguido por selección celular como se describió previamente. Las células T de alta avidéz obtenidas de ese modo se usan luego para identificar y aislar TCR para determinación de secuencias de aminoácidos/ADN y clonado en vectores de expresión usando métodos descritos en el arte.

En un aspecto, MAG-003 y sus variantes, es decir, p286-1Y2L (con 2 sustituciones de aminoácido, SEQ ID NO:13) y p286-1Y2L9L (con 3 sustituciones de aminoácido, SEQ ID NO:14) exhiben una potente afinidad de unión y estabilidad hacia la molécula HLA-A*0201. En particular, p286-1Y2L9L

mostró la capacidad de inducir CTL específicos que, en n aspecto, lisan a las células cancerosas blanco de los PBMC de los donantes sanos y los ratones transgénicos para HLA-A2.1 /Kb. Véase, por ejemplo, (Wu y col. 2011), cuyo contenido se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Para obtener TCR con alta avidéz para MHC I o II/p286-1Y2L o complejos p286-1Y2L9L, se pueden usar estos péptidos en los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2. Las células T de alta avidéz obtenidas de ese modo se usan luego para identificar y aislar TCR para determinación de secuencias de aminoácidos/ADN y para clonado en vectores de expresión usando métodos descritos en el arte.

Ejemplo 3: Clonado de TCR

Los métodos de clonado de TCR con conocidos en el arte, por ejemplo, como se describe en U.S. 8.519.100, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad para dichos métodos. Se usan el oligonucleótido específico de secuencia para la región variable de cadena alfa A1 (ggaattccatattgagtcaacaaggagaagaagatcc SEQ ID NO:26) que codifica para el sitio de restricción NdeI, una metionina introducida para el inicio eficiente de la expresión en bacterias, y el oligonucleótido específico de secuencia para la región constante de cadena alfa A2 (ttgtcagtcgacttagagtctctcagctggtacacg SEQ ID NO:27) que codifica para el sitio de restricción Sall para amplificar la región variable de cadena alfa. En el caso de la cadena beta, se usó el oligonucleótido específico de secuencia para la región variable de cadena beta B1 (tctctcatattggtggtggaattactcaatcccaa SEQ ID NO:28) que codifica para el sitio de restricción NdeI, una metionina introducida para el inicio eficiente de la expresión en bacteria, y el oligonucleótido específico de secuencia para la

región constante de cadena beta B2 (tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtggc SEQ ID NO:29) que codifica para el sitio de restricción AgeI para amplificar la región variable de cadena beta.

Las secuencias de ADN que codifican para la cadena alfa de TCR cortadas con NdeI y Sall se ligaron en el vector pGMT7+C α , que se cortó con NdeI y XhoI. Las secuencias de ADN que codifican para la cadena beta de TCR cortadas con NdeI y AgeI se ligaron en vectores pGMT7+C β separados, que también se cortaron con NdeI y AgeI. Los plásmidos ligados se transforman en células *Escherichia coli* competentes de la cepa XL1-blue y se plaquean en placas de LB/agar que contienen 100 μ g/ml de ampicilina. Después de una incubación durante una noche a 37° C, se toman colonias individuales y se hacen crecer en 10 ml de LB conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina durante una noche a 37° C con agitación. Los plásmidos clonados se purifican usando un conjunto de componentes para Miniprep (Qiagen) y el inserto se secuencia usando un secuenciador automático de ADN (Lark Technologies).

Se aislaron tres TCR (R20P1H7, R7P1D5 y R10P2G12, véase la Tabla 2), cada uno codificando para cadenas alfa y beta de TCR específico de tumor, aisladas y amplificadas a partir de células T de donantes sanos. Las células de los donantes sanos se estimularon in vitro de acuerdo con el método descrito en Walter y col. 2003. Las células específicas de blanco se seleccionaron por colina individual usando multímeros específicos de blanco para subsiguiente aislamiento de TCR. Las secuencias de TCR mediante 5' RACE por métodos estándares como se describe en por ejemplo Molecular Cloning A Laboratory Manual, cuarta edición de Green y Sambrook. Los tres TCR derivaron de

donantes positivos para HLA-A2. Las regiones variables de cadena alfa y beta de los TCR R20P1H7, R7P1D5 y R10P2G12 se secuenciaron.

Se halló que el dominio variable de cadena alfa de TCR R20P1H7 tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos 22-133 de SEQ ID NO:39. Se halló que el dominio variable de cadena beta de TCR R20P1H7 tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos 20-135 de SEQ ID NO:47.

El R7P1D5 dominio variable de cadena alfa de TCR tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos 22-131 de SEQ ID NO:55. El dominio variable de cadena beta de TCR R7P1D5 tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos 20-131 de SEQ ID NO:63.

El dominio variable de cadena alfa de TCR R10P2G12 tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos 21-136 de SEQ ID NO:71. El dominio variable de cadena beta de TCR R10P2G12 tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos 20-134 de SEQ ID NO:79.

Se puede usar la técnica de presentación en fagos para generar bibliotecas de variantes de TCR para identificar a mutantes con alta afinidad. Se pueden aplicar los métodos de presentación en fagos y cribado de TCR métodos que se describen en (Li y col, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) a un TCR de referencia seleccionado a partir de los TCR descritos en la Tabla 2.

Por ejemplo, las tres regiones de CDR de cadena alfa de secuencias de SEQ ID NOs: 39, 55 y 71; y las tres regiones de CDR de cadena beta de secuencias de SEQ ID NOs: 47, 55 y 79 pueden ser modificadas por

mutagénesis, y se puede hacer un paneo y un cribado de cada biblioteca de CDR en forma separada.

En consecuencia, se identifican TCR con afinidades y/o vida media de unión de al menos el doble que las de un TCR de referencia (y por lo tanto implícitamente al menos dos veces que las del TCR nativo).

Se repliegan los heterodímeros de TCR usando el método que incluye las cisteínas introducidas en las regiones constantes para proveer el enlace disulfuro intercatenario artificial. De esa forma se preparan los TCR que consisten en (a) la cadena beta de TCR de referencia, junto con cadenas alfas mutadas; (b) la cadena alfa de TCR de referencia junto con cadenas betas mutadas; y (c) diversas combinaciones de cadenas beta y alfas que incluyen los dominios variables mutantes.

La interacción entre los TCR solubles conectados por disulfuro de alta afinidad, y las variantes de TCR, y el complejo de péptido KVLEHVVRV nativo (SEQ ID NO:1) con HLA-A*02 se puede analizar usando el método BIAcore.

También se pueden seleccionar variantes de TCR con alta avidéz a partir de una biblioteca de mutantes de CDR por presentación en levadura, o en células T (Holler y *col.* 2003; Chervin y *col.* 2008). Las variantes de TCR candidatas, por lo tanto, proveen una guía para el diseño de las mutaciones de las CDR de TCR para obtener variantes de TCR con alta avidéz (Robbins y *col.* 2008; Zoete y *col.* 2007).

Ejemplo 4: Modificación de células T autólogas

Se pueden modificar las células T para que expresen TCR con alta avidéz (llamadas terapias de TCR) o receptores de antígenos quiméricos derivados de proteínas de fusión (CAR) que tienen mayor especificidad de

antígeno contra el complejo MHC I/MAG-003 o el complejo MHC II/MAG-003. En un aspecto, esta estrategia supera algunas de las limitaciones asociadas con la tolerancia central y periférica, y genera células T que será más eficientes para direccionarse a tumores sin el requerimiento de la activación *de novo* de las células T en el paciente.

En un aspecto, para obtener células T que expresan TCR de la presente descripción, se clonan ácidos nucleicos que codifican para las cadenas alfa de TCR y/o beta de TCR específicas de tumor, identificadas y aisladas como se describió en los Ejemplos 1-3, en vectores de expresión, tales como retrovirus gamma o lentivirus. Los virus recombinantes se generan y luego se prueban para ver su funcionalidad, tal como especificidad de antígeno y avidéz funcional. Luego se usa una alícuota del producto final para transducir la población de células T blancos (en general purificadas de PBMC de pacientes), que se expande antes de infundirse en el paciente.

En otro aspecto, para obtener células T que expresan TCR de la presente descripción, se sintetizaron ARN de TCR por técnicas descritas en el arte, por ejemplo, sistemas de transcripción *in vitro*. Los ARN de TCR sintetizados *in vitro* se introdujeron luego en células T CD8+ primarias obtenidas de donantes sanos por electroporación para re-expresar las cadenas alfa de TCR y/o beta de TCR específicas de tumor.

Para determinar la especificidad y afinidad de los TCR, las células T CD8+ transformadas se coincubaron con células blanco cargadas con MAG-003 o con células blanco cargadas con el péptido homólogo pero no relacionado RABGAP1L-001 (SEQ ID NO:91), AXIN1-001 (SEQ ID NO:92), ANO5-001 (SEQ ID NO:93), TPX2-001 (SEQ ID NO:94), SYNE3-001 (SEQ ID

NO:95), MIA3-001 (SEQ ID NO:96), HERC4-001 (SEQ ID NO:97), PSME2-001 (SEQ ID NO:98), HEATR5A-001 (SEQ ID NO:99) o CNOT1-003 (SEQ ID NO:100) o con péptido control NYESO1-001 (SEQ ID NO:101), seguido por ensayo de liberación de IFN- γ . Las células blanco no cargadas y las células T CD8+ solas sirvieron como controles. La secreción de IFN- γ por parte de las células T CD8+ es indicativo de la activación de las células T con actividad citotóxica.

Tabla 11

TCR No.	Código de TCR	Donante/HLA-A2 (+ o -)	IFN γ (pg/ml)	EC50	% de células T CD8+ primarias positivas a MAG-003 TET	% de células T CD8+ primarias positivas a NYESO1-001 TET
1	R7P1D5	HBC-583/(+)	400-1050	~3 nM	7,99	0,87
2	R20P1H7	HBC-689/(+)	200-900	~10 nM	5,73	0,87
3	R10P2G12	HBC-673/(+)	200-1500	~10 nM	5,38	0,87

Como se muestra en las Figuras 5 a 7, todas las células T CD8+ primarias transformadas con los TCR de la presente divulgación, después de la coincubación con las células blanco cargadas con MAG-003, liberaron niveles de IFN- γ mucho mayores que las estimuladas con células blanco cargadas con

péptido no relacionado, y que los controles. El análisis de titulación de péptido blanco mostró rangos de EC50 entre aproximadamente 3 nM y aproximadamente 10 nM (Tabla 11). Estos resultados sugieren que los TCR de la presente invención pueden activar la actividad de las células T citotóxicas, por ejemplo, la liberación de IFN- γ , a través de la interacción específica con el complejo MHC/MAG-003.

La activación de células T se confirmó adicionalmente usando una técnica de tinción de tetrámero para detectar las células T citotóxicas activadas por unión a MHC/MAG-003. Como se muestra en la Figura 8 y la Tabla 11, un mayor porcentaje de células T CD8+ que expresan TCR se tiñeron como positivas para tetrámero de MHC/MAG-003 marcado fluorescentemente en comparación con el tetrámero control MHC/NYESO1-001 o el control. Como control, las células T CD8+ primarias transformadas con los TCR, tales como el TCR 1G4, que se sabe que se une específicamente al complejo MHC/NYESO1-001, se activaron fácilmente mediante las células blanco cargadas con NYESO1-001. Las cadenas alfa y beta del TCR 1G4 se muestran en las SEQ ID NO:89 y 90, respectivamente:

Cadena alfa de 1G4 (SEQ ID NO:89):

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTVQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAI
YNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRSTLYIAASQPG
DSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSV
CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACA
NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAG
FNLLMTLRLWSS

Cadena beta de 1G4 (SEQ ID NO:90):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMN
 HEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLS
 AAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE
 ISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS
 RYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSA
 EAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKD
 SRG

Para determinar el motivo de unión del TCR con el complejo MAG-003/MHC, se llevó a cabo un análisis de barrido posicional de alaninas para cada uno de los 9 aminoácidos del péptido MAG-003. Los péptidos MAG-003 sustituidos con alanina se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Posición:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MAG-003 (SEQ ID NO:1)	K	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A1 (SEQ ID NO:30)	A	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A2 (SEQ ID NO:31)	K	A	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A3 (SEQ ID NO:32)	K	V	A	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A4 (SEQ ID NO:33)	K	V	L	A	H	V	V	R	V
MAG-003 A5 (SEQ ID NO:34)	K	V	L	E	A	V	V	R	V
MAG-003 A6 (SEQ ID NO:35)	K	V	L	E	H	A	V	R	V

NO:35)												
MAG-003 A7 (SEQ ID NO:36)	K	V	L	E	H	V	A	R	V			
MAG-003 A8 (SEQ ID NO:37)	K	V	L	E	H	V	V	A	V			
MAG-003 A9 (SEQ ID NO:38)	K	V	L	E	H	V	V	R	A			

Las células T CD8+ electroporadas con ARN codificando para los TCR de interés se coincubaron con células blanco cargadas con MAG-003, MAG-003-A1 a MAG-003-A9, o con un péptido NYESO1-001 no relacionado, seguido por ensayo de liberación de IFN γ , como se describió previamente.

Los resultados del análisis por barrido posicional de alaninas se muestran en las Figuras 9-11 y se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13

TCR	Posiciones de MAG-003 que permiten la unión de TCR
R7P1D5	1, 3, 5, 7, 8
R20P1H7	1, 3, 4, 5, 7, 8
R10P2G12	1, 2, 3, 4, 5, 8

Un cribado de genoma completo para péptidos de unión a A*02 con un motivo idéntico no reveló péptidos con reacción cruzada potencial para los TCR R20P1H7, R7P1D5 y R10P2G12, respectivamente. Estos resultados sugieren que los TCR descritos en la presente exhiben un patrón de reconocimiento muy específico con un riesgo reducido de efectos fuera de blanco.

Para determinar la eficacia de las células T que expresan los TCR descritos en la presente, se coincubaron las células T CD8+ primarias electroporadas con ARN de los TCR R7P1D5, R20P1H7 y R10P2G12 con diferentes líneas celulares humanas de cáncer, por ejemplo, A-375 (línea celular humana de melanoma, que es positiva para expresión de HLA-A2 y MAG-003), T98G (línea celular humana de glioblastoma, que es positiva para HLA-A2 y negativa para MAG-003), y SK-BR-3 (línea celular humana de cáncer de mama, que es negativa para HLA-A2 y negativa para MAG-003), seguido por ensayo de liberación de IFN γ .

Como se muestra en Figura 12A-C, se observó liberación de IFN γ en las células A-375, que son positivas para HLA-A2 y negativas para MAG-003, pero no en las células T98G y SK-BR-3, que tienen niveles basales de liberación de IFN γ que son comparables a los del control con células efectoras solas. Además, las células T CD8+ transformadas con el TCR R7P1D5, pero no los controles, también exhibieron un incremento de liberación de IFN γ cuando se coincubaron con la línea celular de cáncer de pulmón a células no pequeñas, H1755 (datos no mostrados). Estos resultados indican que las células T que expresan los TCR R7P1D5, R20P1H7 y R10P2G12 pueden inducir específicamente la actividad citotóxica contra las células cancerosas de una forma específica contra HLA-A2/MAG-003.

La presente memoria descriptiva provee TCR que son útiles para tratar cánceres/tumores, preferiblemente melanoma y cáncer de pulmón a células no pequeñas, que sobreexpresan o que presentan exclusivamente MAG-003 presente.

Ejemplo 5: Modificación de células T alogeneicas

Las T gamma delta ($\gamma\delta$), que son efectores de linfocitos T no convencionales implicadas en la primera línea de defensa contra los patógenos, pueden interactuar y erradicar células tumorales de una forma independiente del MHC a través de receptores de activación, entre otros, las cadenas gamma de TCR y delta de TCR. Estas células T $\gamma\delta$ muestran un fenotipo preactivado que les permite una rápida producción de citoquinas (IFN- γ , TNF- α) y una fuerte respuesta citotóxica ante la activación. Estas células T tienen actividad antitumoral contra muchos tipos de cáncer y sugiere que la inmunoterapia mediada por células T $\gamma\delta$ es factible y que esta puede inducir respuestas tumorales objetivas. (Braza y col. 2013).

Avances recientes usando antígenos inmovilizados, anticuerpos monoclonales (mAb) agonistas, células artificiales presentadoras de antígeno derivadas de tumor (aAPC), o combinaciones de mAb activantes y aAPC han sido exitosos para expandir las células T gamma delta con repertorios oligoclonales o policlonales de TCR. Por ejemplo, el complejo mayor de histocompatibilidad de Clase-I relacionado con cadena A inmovilizado fue un estímulo para las células T $\gamma\delta$ que expresan isotipos TCR δ 1, y los anticuerpos activantes unidos a placa han expandido a las células V δ 1 y V δ 2 *ex vivo*. SE han producido cantidades clínicamente suficientes de TCR δ 1, TCR δ 2, y TCR δ 1^{neg}TCR δ 2^{neg} después del cocultivo con aAPC, y estos subgrupos mostraron diferencias en el fenotipo de memoria y la reactividad contra tumores *in vitro* e *in vivo*. (Deniger y col. 2014).

Además, las células T $\gamma\delta$ se pueden modificar genéticamente como se ha evidenciado mediante la introducción de las cadenas alfa de TCR y beta de TCR (Hiasa y col. 2009). Otro aspecto de la presente descripción se relaciona

con la producción de células T $\gamma\delta$ que expresan cadenas alfa de TCR y cadenas beta de TCR que se unen a MAG-003. Para hacerlo, se expanden las células T $\gamma\delta$ por los métodos descritos en Deniger y *col.* 2014, seguidos por la transducción de los virus recombinantes que expresan los TCR que se unen a MAG-003 (como se describe en el Ejemplo 3) en las células T $\gamma\delta$ expandidas. Las células T $\gamma\delta$ transducidas con virus se infunden entonces al paciente.

Ejemplo 6: Seguridad de los TCR específicos para MAG-003

Se aislaron y se amplificaron tres TCR específicos para MAG-003 (R7P1D5, R10P2G12, R20P1H7, véase la Tabla 2), cada uno codificando para cadenas alfa de TCR y beta de TCR específicas de tumor, a partir de células T de los donantes sanos. Las células de los donantes sanos se estimularon *in vitro* de acuerdo con un método descrito previamente (Walter y *col.*, 2003 J Immunol., Nov 15;171(10):4974-8) y las células específicas para blanco se seleccionaron en forma de célula individual usando multímeros de HLA-A*02 y luego se usaron para el subsiguiente aislamiento de los TCR. Las secuencias de TCR se aislaron mediante 5' RACE por métodos estándares como se describe en por ejemplo Molecular Cloning A Laboratory Manual, cuarta edición de Green y Sambrook. Las regiones variables de cadena alfa y beta de los TCR R7P1D5, R10P2G12 y R20P1H7 se secuenciaron y clonaron para caracterización funcional adicional. Los TCR R7P1D5, R10P2G12 y R20P1H7 derivan de un donante positivo para HLA-A*02.

Tabla 13: Tipos de células blanco

Tipo celular	Abreviatura	Fuente
Fibroblastos dérmicos humanos normales	NHDF	Células primarias

Células de músculo liso arterial humano coronario	HCASMC	Células primarias
Células de músculo liso bronquial humano	HBSMC	Células primarias
Células epiteliales renales humanas	HREpC	Células primarias
Cardiomiocitos humanos	HCM	Células primarias
Células endoteliales microvasculares cardiacas humanos	HCMEC	Células primarias
Hepatocitos humanos	HH	Células primarias
Astroцитos humanos	HA	Células primarias
Células perineurales humanas	HPC	Células primarias
Células de meninge humanas	HMC	Células primarias
Neuronas humanas	HN	Células derivadas de iPSC

Los TCR de interés se expresaron en células T humanas a través de electroporación de ARN y las células T se evaluaron para liberación de IFN- γ después de cocultivo con diferentes células blanco, tales como células T2 cargadas con diferentes péptidos así como también líneas celulares tumorales

y células primarias a partir de tejidos sanos. Los datos de activación de células T se muestran en niveles absolutos de IFN- γ o una forma normalizada como se indica más adelante.

La eficacia de las células T CD8+ que expresan los TCR R7P1D5, R10P2G12 y R20P1H7 se determinó por estudios de activación de células T (Liberación de IFN- γ) usando diferentes líneas celulares tumorales como células blanco. La caracterización del perfil de seguridad de los TCR de interés se realizó probando la activación potencial de las células T que expresan TCR ante el cocultivo con tipos celulares primarios aislados a partir de tejidos sanos y tipos celulares derivados de células madres pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de donantes positivos para HLA-A*02 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los tipos celulares se seleccionaron de manera de cubrir la mayor parte de los órganos críticos como por ejemplo cerebro, corazón e hígado y diferentes tipos celulares como epitelio, endoepitelio o músculo liso. Las líneas celulares tumorales se analizaron lado a lado como controles positivo y negativos.

Método de normalización para liberación de IFN γ :

$$\text{Media}_{\text{norm}}(\text{TCRoi}; \text{co}) = [\text{Media}(\text{TCRoi}; \text{co}) - \text{Media}(\text{TCRoi}; \text{efectora sola})] - [\text{Media}(\text{control}; \text{co}) - \text{Media}(\text{control}; \text{efectora sola})]$$

El CV_{norm} respectivo se calculó de la siguiente forma:

$$\text{CV}_{\text{norm}}(\text{TCRoi}; \text{co}) = [\text{CV}(\text{TCRoi}; \text{co})^2 + \text{CV}(\text{TCRoi}; \text{efectora sola})^2 + \text{CV}(\text{control}; \text{co})^2 + \text{CV}(\text{control}; \text{efectora sola})^2]^{1/2}$$

TCRoi = células efectoras que expresan TCR de interés

Control = células efectoras sin expresión de TCR exógeno

Co = células efectoras cocultivadas con células blanco

Efectora sola	= células efectoras no cocultivadas
Media _(norm)	= Media de liberación de IFN γ (normalizada)
CV _(norm)	= coeficiente de variación (normalizado)

Resultados:

Para las células T CD8+ que expresan los TCR R7P1D5, R10P2G12 o R20P1H7, no se observó activación ante el cocultivo con los tipos celulares positivos para HLA-A*02 de tejidos sanos (véase la Figura 13), mientras que hubo una actividad hacia las líneas celulares tumorales A-375 y NCI-H1755 que expresan HLA-A*02 y MAGEA4 como gen fuente para el péptido MAG-003. Se observó un patrón similar de reactividad con las células T CD8+ que expresan el TCR 1G4 específico para NYESO1, que se halló reactivo para las NYESO1 líneas celulares tumorales que expresan HLA-A*02 pero no para el panel indicado de células de tejidos sanos.

La activación de las células T ante el cocultivo con las líneas celulares que expresan HLA-A*02 y MAGEA4 refleja el reconocimiento del blanco pHLA endógenamente expresado y procesado por los TCR R7P1D5, R10P2G12 y R20P1H7.

El análisis de seguridad indica la ausencia de reactividad cruzada inesperada o potencial aloreactividad de los TCR R7P1D5, R10P2G12 y R20P1H7 hacia las células primarias de tejidos sanos. Esto es notorio debido a que los tipos celulares primarios ensayados representan miles de ligandos HLA normales en el contexto de HLA-A*02 y probablemente también representan alelos HLA alogeneicos adicionales que varían de tipo celular normal a tipo celular normal.

Ejemplo 7: Expresión lentiviral de los TCR de la invención

Los productos de las células T se generaron comenzando a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) total completa aislada de donantes sanos después de un proceso de fabricación ACTengine de pequeña escala. El esqueleto del vector lentiviral que expresa el TCR R7P1D5 de la invención para la elaboración de las células T ACTengine se diseñó en base a estudios previos y a múltiples ensayos clínicos (Porter y col., 2011; Kalos y col., 2011; y otros). En forma breve, se activaron PBMC descongeladas y reposadas con anticuerpos anti-CD3/CD28 y se transdujeron con sobrenadantes virales concentrados elaborados usando diversos vectores lentivirales que portan el transgén del TCR R7P1D5 con diferentes orientaciones de las cadenas α y β y diversas combinaciones de secuencias promotoras y potenciadoras (las construcciones se denominaron como R71-R78). Dos de las 8 construcciones (R74, R75) fueron eliminadas debido a títulos bajos y/o baja productividad. Las células transducidas con los restantes 6 sobrenadantes virales se expandieron y evaluaron para expresión del transgén por citometría de flujo.

Las orientaciones fueron como sigue: Alfa-beta: R71, R72, 75, 76; beta-alfa: R73, R74, R77, 78, IG4.

Todos los productos de las células T mostraron viabilidad, porcentaje de linfocitos así como también de células T CD3+ comparables. El porcentaje de células T CD4+ y CD8+ varió entre los donantes. No se observaron diferencias en términos de toxicidad entre los 6 sobrenadantes virales. La construcción de TCR lentiviral R7P1D5 R73 indujo consistentemente una mayor expresión de TCR detectada sobre la superficie por unión a tetrámero. En base a la expresión de transgén, las construcciones lentivirales siguen el siguiente orden: R73>R78>R77>R71>R76>R72 (Figura 14).

Se hicieron experimentos adicionales con 2 nuevos donantes para confirmar la capacidad de transducción del virus R7P1D5 TCR R73. Las células transducidas de todos los experimentos se probaron para evaluación funcional en ensayos de liberación de citoquinas y de muerte. En todos los donantes ensayados, las células T transducidas con R73 derivadas de PBMC completas de cuatro donantes exhibió una producción significativamente mayor de IFN γ ante el cocultivo con células A375 que expresan el antígeno MAGE-A4 en comparación con las células T no transducidas (Figura 15A). La respuesta de IFN γ fue estrictamente específica de antígeno debido a que la inducción en presencia de células MCF-7 que carecen de expresión de MAGE-A4 estuvo por debajo de los niveles de fondo. Además, el valor de EC₅₀ obtenido de las curvas de titulación de T2, que representan las cantidades de IFN γ detectadas en respuesta a la concentración decreciente de péptido MAG-003, fue de 10,0 nM para ambos donantes (Figura 15B).

Además de la liberación de citoquinas, los productos de las células T transducidas con TCR R7P1D5 (virus R73) se probaron en un ensayo de muerte con liberación de Cr51 de 4 horas. Se evaluó el reconocimiento y la lisis de las células tumorales A375 MAGE-A4+ que presentan péptido MAG-003 endógenamente procesado. Las células T transducidas con R73 mostraron una muerte en aumento sobre las células no transducidas para todas las proporciones de E:T (Figura 16A, B). Los efectos citotóxicos vistos con las células transducidas con R73 estuvieron mediados en una forma específica de antígeno debido a que el porcentaje de lisis observada con los blancos MAGE-A4+ fue significativamente mayor que el observado con las células blanco negativas para MAGEA- A4 (Figura 16C).

Lista de Referencias

Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.

Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.

Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.

Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778-2785.

Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.

Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rughetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.

Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J Cancer* 125, 1365-1371.

Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 28, 1498-1502.

Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.

Cabazon T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013). Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* 12, 381-394.

Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 23-35.

Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95, 3530-3533.

Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis

antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.

Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.

Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* 17, 7058-7066.

Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.

Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjatich S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS ONE*. 9, e104099.

Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* 29, 3329-3337.

Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in

esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.

Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.

Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.

Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J Mol. Med.* 35, 1675-1682.

Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012). MAGE-4 gene m-RNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* 29, 3055-3062.

Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.

Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. Clin Dev. Immunol. 2010, 567594.

Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishi-kawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshi-oka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. Clin. Cancer Res.

Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. PLoS. ONE. 10, e0118927.

Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. Gynecol. Oncol 76, 336-339.

Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. Int. J Clin Exp. Pathol. 8, 743-750.

Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. Tissue Antigens 62, 426-432.

Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4

tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* 100, 702-705.

Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.

Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 17, 3559-3563.

Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.

Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.

Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.

Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggiaro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011). Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* 33, 1426-1432.

Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C,

Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.

Miyahara Y, Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Takemitsu T, Yuta A, Majima Y, Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11, 5581-5589.

Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggioro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 1123-1128.

Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-10674.

Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8⁺ T-cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4⁺ T-cells. *J Immunol. Methods* 314, 54-66.

Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.

Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.

Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* 100, 1135-1143.

Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 867-872.

Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.

Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.

Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.

Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis

antigen expression in gastroin-testinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.

Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.

Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17, 387-391.

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).

Resnick MB, Sabo E, Kondratev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.

Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J Oncol.* 26, 817-824.

Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune

responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901-5907.

Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 279, 15505-15514.

Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.

Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.

Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemo-resistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.

Shichijo S, Hoshino T, Koufuji K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J Cancer Res* 88, 414-419.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical

significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.

Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammanull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.

Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.

Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.

Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.

Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka Y, Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.

Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.

Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Bühring HJ, Rammensee HG, Stevanović S. (2003). Cutting edge: predetermined avidity of

human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8

Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Com-bined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.

Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+ T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in oesophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.

Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.

Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of can-cer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, can-cer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 can-cer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.

Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.

Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected can-cer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch.* 462, 565-574.