PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO ANTI CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ESOFÁGICO 1 DE NUEVA YORK (NY-ESO-1) Y MÉTODOS DE USO

SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 62/870,232, presentada el 3 de julio de 2019, la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 63/020,177, presentada el 5 de mayo de 2020, y la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 63/021,826, presentada el 8 de mayo de 2020. El contenido completo de cada una de las anteriores se incorpora a la presente mediante esta referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias presentado en forma electrónica en formato ASCII y que se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 2 de julio de 2020, se denomina 118003_10520_SL.txt y tiene un tamaño de 245,227 bytes.

CAMPO

La presente descripción se refiere a proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presente en HLA y métodos terapéuticos y de diagnóstico para el uso de estas proteínas de unión.

ANTECEDENTES

El carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1, por sus siglas en inglés) es un antígeno de cáncer testicular (CTA, por sus siglas en inglés), también denominado CTAG1B. La expresión de NY-ESO-1, codificada por el gen *CTAG1B*, se restringe a células germinales. Sin embargo, el NY-ESO-1 se re-expresa a menudo de manera aberrante por parte de diferentes tipos de tumor. El producto proteico principal del gen CTAG1B, es una proteína de 180 aminoácidos de longitud de 18 KDa con una región de extremo N rica en glicina y una región de extremo C extremadamente hidrofóbica. Sin embargo, la función del NY-ESO-1 sigue siendo incierta.

Se han observado y analizado las respuestas espontáneas de linfocitos T $CD8^+$ y $CD4^+$ al NY-ESO-1 en pacientes con cáncer (Jager, E. *et ál.* (1998) *J Exp Med* 187:265-270; Jager, E. *et ál.* (2000) *J Exp Med* 191:628-630). En particular, se descubrió que los péptidos 157-165, 157-167 y 155-163 del NY-ESO-1 están restringidos por HLA-A2 en líneas de linfocitos T $CD8^+$ que reaccionan al tumor, y los péptidos 56-62 son reconocidos por los linfocitos T $CD8^+$ T HLA-A31 (Jager *et ál.* (1998) *J. Exp Med* 187:265-270; Wang, R.F. *et ál.* (1998) *J. Immunol* 161:3598-3606). También se han demostrado varios epítopos restringidos por HLA-DR4 en las respuestas de linfocitos T CD4 y las respuestas contra los péptidos 157-170 fueron restringidas por HLA-DP4, un alelo que se encuentra en la mayoría de los caucásicos (Jager *et al*. (2000) *J Exp Med* 191:625-

630; Zang *et ál.* (2001) *Proc Natl Acd Sci USA* 98:3964-3969).

La capacidad de NY-ESO-1 de provocar respuestas inmunitarias celulares y humorales espontáneas, junto con su patrón de expresión restringido, lo han tornado un buen candidato de diana para la terapia contra el cáncer. Aunque el antígeno del NY-ESO-1 se ha evaluado como un candidato para la vacuna contra el cáncer, se han obtenido pocas respuestas inmunitarias celulares y humorales completas. De hecho, el uso de NY-ESO-1 como una diana terapéutica es desafiante dado que la dificultad al diseñar proteínas de unión al antígeno que se dirigen a antígenos presentados en HLA y la necesidad de evitar la unión fuera de la diana, para prevenir la unión no específica que puede conducir a menor eficacia terapéutica y/o mayores efectos adversos (p. ej., citotoxicidad no específica que disminuye la actividad de destrucción de células tumorales y/u ocasiona efectos secundarios en los sujetos).

Por consiguiente, hay una necesidad insatisfecha en la técnica de nuevas estrategias terapéuticas para dirigirse al NY-ESO-1 con alta especificidad y para tratar cánceres asociados con el NY-ESO-1.

BREVE COMPENDIO

La presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presente en HLA. Las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción se unen con un alto grado de especificidad al NY-ESO-1 presente en HLA y no se unen a péptidos presentes en HLA que difieren en 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos. Las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción permiten el direccionamiento específico de células que presentan el péptido del NY-ESO-1 (es decir, células que presentan en su superficie un péptido del NY-ESO-1 unido a una molécula MHC, p. ej., HLA-A2), tal como células cancerosas que expresan el NY-ESO-1 y, en algunas modalidades, la estimulación de la activación de linfocitos T, p. ej., para estimular la destrucción mediada por linfocitos T de tales células. Además, cuando se fusionan con un resto detectable, las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción permiten el diagnóstico y el pronóstico de las enfermedades o trastornos positivas para NY-ESO-1 con alta sensibilidad a cambios en la cantidad y distribución de células que presentan péptidos del NY-ESO-1, un indicador más relevante de la evolución de la enfermedad que los niveles de NY-ESO-1 circulantes.

Las proteínas de unión al antígeno de la descripción pueden ser anticuerpos, tales como anticuerpos de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender solamente una parte de unión al antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab, $F(ab')_2$ o scFv), y se pueden modificar para afectar la funcionalidad, p. ej., para eliminar las funciones

efectoras residuales (Reddy *et ál.,* 2000*, J. Immunol*. 164:1925-1933). En algunas modalidades, las proteínas de unión al antígeno de la descripción pueden ser anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno puede ser biespecífica.

En un primer aspecto, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno recombinantes que se unen específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presente en HLA, tal como un péptido presente en HLA que comprende los residuos de aminoácido 157-165 del NY-ESO-1. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno son anticuerpos. En algunas modalidades, los anticuerpos son completamente humanos.

Los ejemplos de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción se enumeran en las Tablas 1 y 2 de la presente. La Tabla 1 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (HCVR, por sus siglas en inglés), las regiones variables de cadena ligera (LCVR, por sus siglas en inglés), las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3, por sus siglas en inglés) y las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3, por sus siglas en inglés) de los ejemplos de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1. La Tabla 2 establece los identificadores de secuencia de ácido nucleico de las HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los ejemplos de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1.

La presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99.5 %, al menos 99.9 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a esta. En algunas modalidades, una proteína de unión al antígeno con identidad de secuencia menor que 100 % comprende secuencias de la CDR de una HCVR de la Tabla 1. Por ejemplo, tal proteína de unión al antígeno puede comprender aquellas secuencias de la CDR, pero tener diferencias en una región del marco en comparación con la HCVR de la Tabla 1.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las

secuencias de aminoácidos de la LCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, al menos 99.5 %, al menos 99.9 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a esta. En algunas modalidades, una proteína de unión al antígeno con identidad de secuencia menor que 100 % comprende secuencias de la CDR de una LCVR de la Tabla 1. Por ejemplo, tal proteína de unión al antígeno puede comprender aquellas secuencias de la CDR, pero tener diferencias en una región del marco en comparación con la LCVR de la Tabla 1.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de una HCVR y una LCVR (HCVR/LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCVR enumeradas en la Tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCVR enumeradas en la Tabla 1. De acuerdo con determinadas modalidades, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR contenido dentro de cualquiera de los ejemplos de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 enumerados en la Tabla 1. En determinadas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219 y 230/238. En determinadas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR se selecciona de una de las SEQ ID NO: 2/10 (p. ej., mAb24955N), 22/30 (p. ej., mAb24956N), 42/50 (p. ej., mAb24958N) y 62/70 (p. ej., mAb24959N).

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 que no tiene más de cinco sustituciones de aminoácidos y dicha LCVR comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 que no tiene más de cinco sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que no tiene más de cinco sustituciones de aminoácidos, y dicha LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 que tiene no más de cinco sustituciones de aminoácidos. En otra modalidad de ejemplo, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR comprende una

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que tiene al menos una sustitución de aminoácido, y dicha LCVR comprende una sustitución de aminoácido de la SEQ ID NO: 10 que tiene al menos una sustitución de aminoácido.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCDR1 enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una CDR de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCDR2 enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCDR3 enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCDR1 enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de

identidad de secuencia.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una CDR de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCDR2 enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCDR3 enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de la HCDR3 y de la LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCDR3 indicadas en la Tabla 1 emparejada con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCDR3 indicadas en la Tabla 1. De acuerdo con determinadas modalidades, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 contenido dentro de cualquiera de los ejemplos de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 enumerados en la Tabla 1. En determinadas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8/16 (p. ej., mAb24955N), 28/36 (p. ej., mAb24956N), 48/56 (p. ej., mAb25958N) y 68/76 (p. ej., mAb24959N).

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR comprende la HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido, la HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido y la HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido. En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona

proteínas de unión al antígeno que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha LCVR comprende la LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido, la LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido y la LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido. Por ejemplo, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha HCVR comprende la HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 4 en 1 aminoácido, la HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 6 en 1 aminoácido y la HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 8 en 1 aminoácido. En otra modalidad de ejemplo, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden una HCVR y una LCVR, dicha LCDR comprende la LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 12 en 1 aminoácido, la LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 14 en 1 aminoácido y la LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 16 en 1 aminoácido.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de los ejemplos de proteínas de unión al antígeno enumerados en la Tabla 1. En determinadas modalidades, el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (p. ej., mAb24955N), 24-26-28-32-34-36 (p. ej., mAb24956N), 44-46-48-52-54-56 (p. ej., mAb24958N) y 64-66-68-72-74-76 (p. ej., mAb24959N).

En una modalidad relacionada, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR, según se define mediante cualquiera de los ejemplos de proteínas de unión al antígeno enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno que comprenden el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 comprendidas dentro de un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR

que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10 (p. ej., mAb24955N), 22/30 (p. ej., mAb24956N), 42/50 (p. ej., mAb24958N) y 62/70 (p. ej., mAb24959N).

Los métodos y técnicas para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de la HCVR y la LCVR son conocidos en la técnica y se pueden usar para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR especificadas, descritas en la presente. Los ejemplos de convenciones que se pueden utilizar para identificar los límites de las CDR incluyen, p. ej., la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructural y la definición de AbM es un arreglo entre los enfoques de Kabat y de Chothia. Ver, por ejemplo, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et ál., J. Mol. Biol*. 273:927-948 (1997); y Martin *et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). También hay bases de datos públicas disponibles para identificar las secuencias de CDR dentro de una proteína de unión al antígeno.

La presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 con un patrón de glicosilación modificado. En algunas modalidades, puede ser útil la modificación para eliminar sitios de glicosilación no deseados o, un anticuerpo que carece de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacáridos, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) (ver Shield *et ál.* (2002) *JBC* 277:26733). En otras aplicaciones, se puede realizar la modificación de galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción son anticuerpos monoclonales que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de la HCVR y la LCVR (HCVR/LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCVR enumeradas en la Tabla 1 emparejada con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCVR enumeradas en la Tabla 1. En determinadas modalidades, los anticuerpos monoclonales comprenden un dominio Fc de un isotipo que se selecciona del grupo que consiste en IgA, IgD, IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM y una variante de estas.

La presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno, o fragmentos de unión al antígeno de estas, que comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HC enumeradas en la Tabla 3, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90

%, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta. En algunas modalidades, una proteína de unión al antígeno con identidad de secuencia menor que 100 % comprende secuencias de la CDR de una HC de la Tabla 3. Por ejemplo, tal proteína de unión al antígeno puede comprender aquellas secuencias de la CDR, pero tener diferencias en una región del marco en comparación con la HC de la Tabla 3.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno, o fragmentos de unión al antígeno de estas, que comprenden una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LC enumeradas en la Tabla 3, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta. En algunas modalidades, una proteína de unión al antígeno con identidad de secuencia menor que 100 % comprende secuencias de la CDR de una LC de la Tabla 3. Por ejemplo, tal proteína de unión al antígeno puede comprender aquellas secuencias de la CDR, pero tener diferencias en una región del marco en comparación con la LC de la Tabla 3.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno, o fragmentos de unión al antígeno de estas, que comprenden un par de secuencia de aminoácidos de HC y LC (HC/LC) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HC enumeradas en la Tabla 3 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LC enumeradas en la Tabla 3. De acuerdo con determinadas modalidades, la presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HC/LC contenido dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-NY-ESO-1 de ejemplo indicados en la Tabla 3. En determinadas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos de HC/LC se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18/20, 38/40, 58/60 y 78/80. En determinadas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos de HC/LC se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18/20, 38/40, 58/60 y 78/80.

En un aspecto, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno o fragmentos de unión al antígeno de estas que se unen a un complejo HLA-péptido en donde la proteína de unión al antígeno o el fragmento de unión al antígeno de esta se pone en contacto con al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de los residuos de aminoácido del péptido comprendido en el complejo HLA-péptido. En determinadas modalidades, la proteína de unión al

antígeno o el fragmento de unión al antígeno de esta «cubre» o se pone en contacto con todos los residuos de aminoácido del péptido comprendido en el complejo HLA-péptido. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno o el fragmento de unión al antígeno de esta se une a un complejo HLA-péptido con alta afinidad y especificidad, en donde la proteína de unión al antígeno o el fragmento de unión al antígeno de esta se pone en contacto con toda la longitud del péptido exhibido. «Contacto», como se usa en la presente incluye enlaces de hidrógeno directos o mediados por agua, interacciones carga-carga o interacciones hidrofóbicas/van der Waals. En una modalidad, la proteína de unión al antígeno o el fragmento de unión al antígeno de esta se une al complejo HLA-A2-péptido de NY-ESO-1 157-165 en donde la proteína de unión al antígeno se une a al menos 3 de 9 residuos de aminoácido del péptido 157-165 (SEQ ID NO: 269) y a HLA-A2 de tal forma que la proteína de unión al antígeno se centra más o menos en el péptido en la ranura de unión al péptido HLA-A2, «cubriendo» (bloqueando físicamente) así el complejo HLA-A2-péptido. En otra modalidad, la proteína de unión al antígeno o el fragmento de unión al antígeno de esta se une al complejo HLA-A2-péptido de NY-ESO-1 157-165 en donde la proteína de unión al antígeno se une a al menos 3 de 9 residuos de aminoácido del péptido 157-165 (SEQ ID NO: 270 o 291) y a HLA-A2 de tal forma que la proteína de unión al antígeno se centra más o menos en el péptido en la ranura de unión al péptido HLA-A2, «cubriendo» (bloqueando físicamente) así el complejo HLA-A2-péptido. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno o el fragmento de unión al antígeno de esta comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, en donde cada una de la HCVR y la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias de la HCVR y la LCVR enumeradas en la Tabla 1. En una modalidad, la proteína de unión al antígeno es completamente humana. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno completamente humanas no se obtienen usando métodos y tecnologías de expresión en fagos. En algunas modalidades, las proteínas de unión al antígeno comprenden una región variable de cadena ligera del subtipo IGKV1-39. En algunas modalidades, las proteínas de unión al antígeno comprenden una región variable de cadena ligera del subtipo IGKJ1.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígenos o fragmentos de unión al antígeno de estas que se unen al complejo HLA-A2: péptido de NY-ESO-1 157-165, en donde la proteína de unión al antígeno se une a uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 269. En una modalidad, la proteína de unión al antígeno se une a al menos 3 aminoácidos de la SEQ ID NO: 269.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno o fragmentos de unión al antígeno de estas que se unen al complejo HLA-A2: péptido de NY-ESO-1 157-165, en donde la proteína de unión al antígeno se une a uno o más aminoácidos de la SEQ

ID NO: 270 o 291. En una modalidad, la proteína de unión al antígeno se une a al menos 3 aminoácidos de la SEQ ID NO: 270 o 291. En una modalidad, la proteína de unión al antígeno se une a uno o más aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en M160, W161 y Q164 de la SEQ ID NO: 270.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona una proteína de unión al antígeno que se une específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presente en HLA, en donde el epítopo conformacional comprende uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 269.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona una proteína de unión al antígeno que se une específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presente en HLA, en donde el epítopo conformacional comprende uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 270 o 291. En esas determinadas modalidades, el epítopo conformacional comprende uno o más aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en M160, W161 y Q164 de la SEQ ID NO: 270 o 291.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que compiten por unión específica a HLA-A2:NY-ESO-1 con una proteína de unión al antígeno que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, en donde cada una de la HCVR y la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias de la HCVR y la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que compiten de forma cruzada por la unión a HLA-A2:NY-ESO-1 con una proteína de unión al antígeno de referencia que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, en donde cada una de la HCVR y la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias de la HCVR y la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

La presente descripción también proporciona proteínas de unión al antígeno que se unen al mismo epítopo como una proteína de unión al antígeno de referencia que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, en donde cada una de la HCVR y la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las secuencias de la HCVR y la LCVR enumeradas en la Tabla 1. En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que se unen al mismo epítopo como una proteína de unión al antígeno de referencia que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, en donde la HCVR se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 22, 42 y 62; y la LCVR se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 30, 50 y 70.

En una modalidad, la descripción proporciona una proteína de unión al antígeno recombinante que

se une específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presentado por HLA-A2, en donde la proteína de unión al antígeno tiene una propiedad que se selecciona del grupo que consiste en: (a) unirse a complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165 monomérico (C165 o V165) con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de unión menor que alrededor de 1 nM según se mide en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales a 25 °C; (b) unirse a un complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165 que expresa células con una EC_{50} menor que alrededor de 10 nM y no se une a células que expresan péptidos fuera de la diana previstas como se determina mediante un ensayo de citometría de flujo y (c) el epítopo comprende uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 269, 270 o 291. Como se describe en otra parte de la presente, un «péptido fuera de la diana» se refiere a un péptido que difiere en 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos de un péptido diana (p. ej., péptido de NY-ESO-1 157-165 (SEQ ID NO: 269 y/o SEQ ID NO:270 o 291)).

En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1. Por ejemplo, la presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la HCVR enumeradas en la Tabla 1; en determinadas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la LCVR enumeradas en la Tabla 1; en determinadas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la HCDR1 enumeradas en la Tabla 1; en determinadas

modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la HCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la HCDR2 enumeradas en la Tabla 1; en determinadas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la HCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la HCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en determinadas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la HCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la LCDR1 enumeradas en la Tabla 1; en determinadas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la LCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la LCDR2 enumeradas en la Tabla 1; en determinadas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la LCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácido de la LCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en determinadas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la LCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, en donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de HCDR1-HCDR2-HCDR3 es como se define mediante cualquiera de los ejemplos de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 enumerados en la Tabla 1.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos de LCDR1-LCDR2-LCDR3 es como se define mediante cualquiera de los ejemplos de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 enumerados en la Tabla 1.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una HCVR como una LCVR, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCVR enumeradas en la Tabla 1 y en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la LCVR enumeradas en la Tabla 1. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera de las secuencias

de ácido nucleico de la HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta, y una secuencia de polinucleótidos que se selecciona de cualquiera las secuencias de ácido nucleico de la LCVR enumerados en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con respecto a esta. En determinadas modalidades de acuerdo con este aspecto de la descripción, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y una LCVR, donde tanto la HCVR como la LCVR derivan de la misma proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 enumerado en la Tabla 1.

La presente descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de cadena pesada enumeradas en la Tabla 3. La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de cadena ligera enumeradas en la Tabla 3.

La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una cadena pesada (HC) como una cadena ligera (LC), en donde la HC comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HC enumeradas en la Tabla 3 y en donde la LC comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LC enumeradas en la Tabla 3.

En un aspecto relacionado, la presente descripción proporciona vectores de expresión recombinantes que pueden expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y/o ligera de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1. Por ejemplo, la presente descripción incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de la HCVR, la LCVR y/o la CDR como se establecen en la Tabla 1. La presente descripción también proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una cadena pesada y/o ligera de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1. Por ejemplo, la presente descripción incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las

secuencias de cadena pesada o cadena ligera como se establecen en la Tabla 2. También se incluyen dentro del alcance de la presente descripción células hospedadoras en las cuales se han introducido dichos vectores, así como métodos para producir las proteínas de unión al antígeno al cultivar las células hospedadoras en condiciones que permiten la producción de las proteínas de unión al antígeno, y recuperar las proteínas de unión al antígeno producidas de este modo.

En un tercer aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno recombinante que se une específicamente a un epítopo conformacional de un péptido NY-ESO-1 presentado por HLA-A2 (p. ej., un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 de NY-ESO-1) y un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la descripción presenta una composición que es una combinación de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 y un segundo agente terapéutico. En una modalidad, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combina de forma favorable con una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1. Los agentes de ejemplo que pueden combinarse de forma favorable con una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 incluyen, de manera no taxativa, otros agentes que modulan la activación de células inmunes. Las terapias adicionales que se pueden usar junto con las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción se describen en otra parte de la presente.

En un cuarto aspecto, la descripción proporciona métodos para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno asociado con el NY-ESO-1, tal como un cáncer positivo para NY-ESO-1. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción o una composición farmacéutica de la descripción al sujeto que lo necesite. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejore, alivie, inhiba o prevenga mediante las proteínas de unión al antígeno y las composiciones proporcionadas en la presente. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno (o composición farmacéutica) de la descripción se administra junto con un segundo agente terapéutico al sujeto que lo necesita. El segundo agente terapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en un anticuerpo de un co-inhibidor de linfocitos T, un anticuerpo de un antígeno de célula tumoral, un anticuerpo de un receptor de linfocitos T, un agente citotóxico, un fármaco contra el cáncer, un fármaco anti-inflamatorio (p. ej., corticosteroides), un agente quimioterapéutico, cirugía, terapia de radiación, un inmunosupresor y cualquier otro fármaco o terapia conocida en la técnica. En determinadas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que ayude a contrarrestar o reducir cualesquiera posibles efectos secundarios asociados con la proteína de unión al antígeno de la descripción, si ocurrieran tales

efectos secundarios.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para suprimir el crecimiento de un cáncer asociado con NY-ESO-1. Por ejemplo, la presente descripción proporciona métodos para suprimir el crecimiento tumoral debido a un tumor primario o un tumor metastásico en un sujeto. En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para mejorar la supervivencia (p. ej., supervivencia libre de evolución o supervivencia general) de un sujeto con un cáncer asociado con NY-ESO-1. Los ejemplos de cáncer incluyen, de manera no taxativa, un liposarcoma, un neuroblastoma, un mieloma, un melanoma metastásico, un sarcoma sinovial, un cáncer de vejiga, un cáncer del esófago, un cáncer hepatocelular, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, tumor astrocítico, glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, tumor cerebral, cáncer de trompas de Falopio, cáncer epitelial de ovario, cáncer de cavidad peritoneal primario, tumores sólidos avanzados, sarcoma de tejido blando, melanoma, un sarcoma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma sinovial, tumores sólidos metastásicos, cáncer de esófago, rabdomiosarcoma, mixoide avanzado, liposarcoma de célula redonda, melanoma metastásico o cáncer de pulmón no microcítico recurrente.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para inhibir o suprimir el crecimiento de cánceres establecidos. Los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno de la presente descripción. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno se administra junto con un segundo agente terapéutico.

La proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, puede administrarse por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, intramuscular o intracraneal. La proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, se puede administrar en una dosis de alrededor de 0.1 mg/kg de peso corporal a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

En un quinto aspecto, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) o una célula que expresa tal CAR (p. ej., una célula que expresa el CAR en su superficie). El CAR puede incluir un dominio de unión extracelular que se une específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presente en HLA, p. ej., los residuos de aminoácidos 157-165 del NY-ESO-1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, el dominio de unión extracelular es una

proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 o un fragmento de unión al antígeno de esta. Los ejemplos de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción son cualquiera de las proteínas de unión al antígeno descritas en la presente.

Por ejemplo, en determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno adecuada para su uso en los CAR de la descripción comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de cualquiera las secuencias de la región variable de cadena pesada (HCVR) enumeradas en la Tabla 1; y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de la región variable de cadena ligera (LCVR) enumeradas en la Tabla 1.

En otras modalidades, la proteína de unión al antígeno adecuada para su uso en los CAR de la descripción comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la HCVR enumeradas en la Tabla 1; y/o una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

En algunas modalidades, la proteína de unión al antígeno adecuada para su uso en los CAR de la descripción comprende (a) una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la HCVR enumeradas en la Tabla 1 y (b) una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

En una modalidad, la proteína de unión al antígeno adecuada para su uso en los CAR de la descripción comprende (a) un dominio de la HCDR1 con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213 y 232; (b) un dominio de la HCDR2 con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 182, 199, 215 y 234, (c) un dominio de la HCDR3 con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217 y 236; (d) un dominio de la LCDR1 con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221 y 240; (e) un dominio de la LCDR2 con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174 y 242; y (f) un dominio de la LCDR3 con una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224 y 244.

En una modalidad adicional, la proteína de unión al antígeno adecuada para su uso en los CAR de la descripción comprende un par de secuencia de aminoácidos de HCVR/LCVR que se selecciona

del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/ 203, 211/219 y 230/238.

En algunas modalidades, la proteína de unión al antígeno para su uso en los CAR de la presente descripción es un scFv.

En otros aspectos, la presente descripción proporciona vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico de CAR aisladas y células efectoras inmunes que comprenden tales vectores.

En aún otros aspectos de la presente descripción, se proporcionan métodos para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado con NY-ESO-1, tal como un cáncer positivo para NY-ESO-1, p. ej., un liposarcoma, un neuroblastoma, un mieloma, un melanoma metastásico, un sarcoma sinovial, un cáncer de vejiga, un cáncer del esófago, un cáncer hepatocelular, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, tumor astrocítico, glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, tumor cerebral, cáncer de trompas de Falopio, cáncer epitelial de ovario, cáncer de cavidad peritoneal primario, tumores sólidos avanzados, sarcoma de tejido blando, melanoma, un sarcoma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma sinovial, tumores sólidos metastásicos, cáncer de esófago, rabdomiosarcoma, mixoide avanzado, liposarcoma de célula redonda, melanoma metastásico o cáncer de pulmón no microcítico recurrente. Los métodos incluyen administrar al sujeto una población de células efectoras inmunes que comprenden un CAR de la descripción.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona métodos para detectar células positivas para NY-ESO-1, p. ej., en un sujeto o en una muestra obtenida de un sujeto. Los métodos incluyen poner en contacto una célula, tal como una muestra celular obtenida de un sujeto, o administrar a un sujeto, una proteína de unión al antígeno de la descripción que comprende un resto detectable, y detectar la presencia del resto detectable.

Otras modalidades serán evidentes al revisar la descripción detallada subsiguiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A ilustra diagramas de tres construcciones de CAR diferentes, lo que incluye promotores y elementos de vector.

La Figura 1B ilustra volúmenes tumorales en ratones tratados con linfocitos T que expresan un CAR BB/z de control sin unión (Control CAR T), el CAR BB/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ o el CAR 28/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ los días 0 a 21. Panel izquierdo: volumen tumoral promedio; panel derecho: volúmenes tumorales para ratones individuales.

La Figura 1C ilustra volúmenes tumorales en ratones tratados con linfocitos T que expresan un CAR BB/z de control sin unión (Control CAR T), el CAR BB/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ o el

CAR 28/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ los días 0 a 38. Panel izquierdo: volumen tumoral promedio; panel derecho: volúmenes tumorales para ratones individuales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de describir estos métodos, se debe entender que esta descripción no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También se entenderá que la terminología utilizada en la presente tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no se pretende que sea taxativa, dado que el alcance de la presente descripción estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Si bien en la práctica o prueba de la presente descripción se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan a esta en su totalidad mediante esta referencia.

Las expresiones «NY-ESO-1», «NY-ESO-1», «carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York» y «CTAG1B» se refieren al antígeno de cáncer testicular (CTA) conocido que se re-expresa en numerosos tipos de cáncer y se codifica por parte del gen *CTAG1B*.

La secuencia de aminoácidos del NY-ESO-1 de longitud completa se proporciona en GenBank como el número de acceso NP_001318.1 (SEQ ID NO:271). El término «NY-ESO-1» incluye NY-ESO-1 recombinante o un fragmento de este. El término también abarca NY-ESO-1 o un fragmento de este acoplado a, por ejemplo, una etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano o una secuencia de señal, tal como ROR1. En determinadas modalidades, el término comprende NY-ESO-1 o un fragmento de este en el contexto de HLA-A2, enlazado a HLA-A2 o como lo presenta HLA-A2.

En determinadas modalidades, un péptido del NY-ESO-1 incluye los aminoácidos 157-165 de la SEQ ID NO: 271 (SLLMWITQC (SEQ ID NO:269)) y se denomina en la presente «péptido de NY-ESO-1_157-165C» o «péptido de NY-ESO-1 (157-165)» (salvo en donde «péptido de NY-ESO-1 (157-165)» se establece además como que tiene una C o una V en la posición 165). En otras modalidades, un péptido de NY-ESO-1 incluye los residuos de aminoácido 157-165 de la SEQ ID NO: 271 en la que la cisteína en el residuo 165 se sustituyó con una valina (SLMMWITQV (SEQ ID NO:270)) y se denomina en la presente «péptido de NY-ESO-1 157-165V » o «(péptido 157-165V) de NY-ESO-1», o indicado de otra manera con «C165V» o «V165». Con el fin de simplificar, se entenderá que, a menos que se especifique, las expresiones «péptido de NY-ESO-1_157-165»,

«(157-165) de NY-ESO-1» y «un péptido que comprende los residuos de aminoácidos 157-165 de NY-ESO-1» comprende tanto un péptido de NY-ESO-1_157-165C como un péptido de NY-ESO-1_157-165V.

El término «HLA» se refiere al sistema o complejo del antígeno de leucocito humano (HLA, por sus siglas en inglés), que es un complejo de genes que codifica las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en seres humanos. Estas proteínas de superficie celular son responsables por la regulación del sistema inmunitario en seres humanos. Los HLA que corresponden a la clase I de MHC (A, B y C) presentan péptidos de dentro de la célula.

El término «HLA-A» se refiere al grupo de antígenos de leucocito humano (HLA) que se codifican por parte del locus HLA-A. HLA-A es uno de los tres tipos principales de los receptores de la superficie celular de clase I de MHC. El receptor es un heterodímero y se compone de una cadena α pesada y cadena β más pequeña. La cadena α se codifica por parte de un gen HLA-A variante y la cadena β (β2-microglobulina) es una molécula de microglobulina β2 invariante.

El término «HLA-A2» es un grupo de alelo de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I particular en el locus HLA-A; la cadena α se codifica por parte del gen HLA-A*02 y la cadena β se codifica por parte de la β2-microglobulina o el locus B2M.

La expresión «proteína de unión al antígeno», «proteína de unión» o «molécula de unión», tal como se usa en la presente, incluye moléculas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno que se une de manera específica a una molécula de interés, tal como un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (péptido de NY-ESO-1) presentado por HLA-A2, p. ej., un péptido presente en HLA-A2 que comprende los residuos de aminoácidos 157-165. Una proteína de unión puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo o un receptor de antígeno quimérico (CAR), o cualquier otro polipéptido, p. ej., una proteína receptor anticuerpo (Rab).

La expresión «proteína de unión al antígeno HLA-A2:NY-ESO-1» o «proteína de unión al antígeno HLA-A2:NY-ESO-1» o similar se refiere a una proteína de unión al antígeno, tal como un anticuerpo o una parte de unión al antígeno de esta, que se une específicamente a un epítopo conformacional mediante la presentación de un fragmento de péptido de NY-ESO-1, p. ej., los residuos de aminoácido 157-165 por parte de HLA-A2. En determinadas modalidades, el epítopo conformacional se crea en la superficie de una célula por parte del péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2. Tal como se usa en la presente, la expresión «complejo de HLA-A2:péptido de NY-ESO-1157-165» o similar se refiere a un complejo entre HLA-A2 y un polipéptido

NY-ESO-1, en donde el HLA-A2 presenta los residuos de aminoácidos 157-165 de NY-ESO-1. En este contexto, el NY-ESO-1 puede ser un polipéptido de NY-ESO-1 de longitud completa o una versión truncada, siempre que los aminoácidos 157-165 (con referencia a la SEQ ID NO: 271) se encuentren presentes en el polipéptido NY-ESO-1 y presentados por el HLA-A2. Para evitar dudas, la expresión « de NY-ESO-1 péptido 157-164» comprende péptidos tan cortos como 157-165 de NY-ESO-1 (con respecto a la SEQ ID NO: 271) o más largos, hasta una proteína NY-ESO-1 de longitud completa inclusive (p. ej., de la secuencia de la SEQ ID NO: 271).

El término «epítopo» se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la región variable de una proteína de unión al antígeno conocida como parátopo. Un antígeno simple puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes proteínas de unión al antígeno pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Además, el término «epítopo» se refiere a un sitio en un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. También se refiere a una región de un antígeno que se encuentra unida mediante una proteína de unión al antígeno. Es posible definir los epítopos como estructurales o funcionales. Por lo general, los epítopos funcionales son un subconjunto de los epítopos estructurales y presentan los residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítopos también pueden ser «conformacionales», es decir, estar compuestos por aminoácidos no lineales. En determinadas modalidades, los epítopos pueden incluir determinantes que son agrupamientos en la superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en determinadas modalidades, pueden presentar características estructurales tridimensionales específicas y/o características de cambio específicas. En algunas modalidades, una proteína de unión al antígeno de la presente descripción interactúa con un epítopo conformacional de un complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1. En algunas modalidades, este epítopo conformacional comprende uno o más aminoácidos (p. ej., uno, dos o tres aminoácidos) que corresponden a M160, W161 y Q164 de la SEQ ID NO: 271. Para determinar aminoácidos que corresponden a uno o más de M160, W161 o Q164, un alineamiento de secuencia puede realizarse como se describe en la presente. En algunas modalidades, una proteína de unión al antígeno de la presente descripción se une específicamente a un complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 que comprende aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 157-165 de la SEQ ID NO: 271, según se determina mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 4.0 Å o más. Para evitar dudas, una resolución de 4.0 Å o más comprende una resolución de 3.9 Å o más, 3.8 Å o más, 3.7 Å o más, 3.6 Å o más, 3.5 Å o más, 3.4 Å o más, 3.3 Å o más, 3.2 Å o más, 3.1 Å o más, 3.0 Å o más, 2.9 Å o más, 2.8 Å o más, 2.7 Å o más, 2.6 Å o más, 2.5 Å o más, 2.4 Å o más, 2.3 Å o más, 2.2 Å o más, 2.1 Å o más,

2.0 Å o más, 1.9 Å o más, 1.8 Å o más, 1.7 Å o más, 1.6 Å o más, 1.5 Å o más, 1.4 Å o más, 1.3 Å o más, 1.2 Å o más, 1.1 Å o más, 1.0 Å o más, 0.9 Å o más, 0.8 Å o más, 0.7 Å o más, 0.6 Å o más o 0.5 Å o más.

En algunas modalidades, una proteína de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este, tal como un anticuerpo de longitud completa o fragmento de unión al antígeno de este.

Se pretende que el término «anticuerpo», tal como se usa en la presente, haga referencia a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, «moléculas de anticuerpo completo»), así como multímeros de estas (p. ej., IgM) o fragmentos de unión al antígeno de estas. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada («HCVR» o «V_H») y una región constante de cadena pesada (que comprende los dominios C_H1, C_H2 y C_H3). Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera («LCVR» o «V_L») y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En determinadas modalidades, las FR del anticuerpo (o de fragmentos de unión al antígeno de ellas) pueden ser iguales a las secuencias de líneas germinales humanas o pueden estar modificadas natural o artificialmente. Es posible definir una secuencia de consenso de aminoácidos con base en un análisis comparativo de dos o más CDR.

También es posible la sustitución de uno o más residuos de CDR o la omisión de uno o más residuos de CDR. En la bibliografía científica se describen las proteínas de unión al antígeno, tales como anticuerpos, en los cuales es posible utilizar una o más CDR para la unión. Padlan *et ál.* (1995 *FASEB J.* 9:133-139) analizaron las regiones de contacto entre anticuerpos y sus antígenos, en función de estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que solamente alrededor de un quinto a un tercio de los residuos de CDR entra realmente en contacto con el antígeno. Padlan también descubrió varios anticuerpos en los que una o dos CDR no presentaban aminoácidos en contacto con un antígeno (ver también Vajdos *et ál.* 2002 *J Mol Biol* 320:415-428).

Los residuos de CDR que no se encuentran en contacto con el antígeno pueden ser identificados de acuerdo con estudios existentes (por ejemplo, normalmente no son necesarios los residuos H60-H65 en CDRH2) en regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de las CDR de Chothia, mediante modelado molecular y/o en forma empírica. Si se omitiera una CDR o uno o

más residuos de esta, normalmente sería sustituida por un aminoácido que ocupara la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de tales secuencias. Las posiciones para la sustitución en CDR y los aminoácidos empleados en la sustitución también pueden ser seleccionados en forma empírica. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras.

Las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1, p. ej., anticuerpos monoclonales anti-HLA-A2:NY-ESO-1 completamente humanos o fragmentos de unión al antígeno de estos o CAR, descritos en la presente pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena ligera y pesada, en comparación con las secuencias de líneas germinales correspondientes. Tales mutaciones pueden ser determinadas fácilmente al comparar las secuencias de aminoácidos descritas en la presente con secuencias de líneas germinales disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos o CAR, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente, en donde uno o más aminoácidos en una o más regiones marco y/o CDR se mutan para transformarse en el o los residuos correspondientes de la secuencia de línea germinal de la que se deriva la proteína de unión al antígeno, o en el o los residuos correspondientes de otra secuencia de línea germinal humana, o en una sustitución conservadora de aminoácido del o de los residuos de línea germinal correspondientes (en la presente se hace referencia a tales cambios en la secuencia como «mutaciones en la línea germinal»). Un experto en la técnica puede producir gran cantidad de proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos o CAR, que comprenden una o más mutaciones individuales de línea germinal o combinaciones de estas a partir de las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada que se describen en la presente. En determinadas modalidades, todos los residuos de marco y/o de CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se mutan de nuevo a los residuos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que se derivó la proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo. En otras modalidades, solo determinados residuos vuelven a mutar en la secuencia de línea germinal original, p. ej., solo los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de la FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de la FR4, o únicamente los residuos mutados que se encuentran dentro de la CDR1, la CDR2 o la CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos de la CDR y/o marco se mutan para transformarse en el o los residuos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal diferente a la secuencia de línea germinal de la que se derivó originalmente el

anticuerpo). Además, las proteínas de unión al antígeno, p. ej., los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos o CAR, de la presente descripción pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones de marco y/o CDR, p. ej., en donde determinados residuos individuales se mutan para transformarse en el residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que ciertos otros residuos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o mutan hacia el residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez que se obtienen, las proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, que contienen una o más mutaciones de línea germinal pueden ser analizados fácilmente para determinar la presencia de una o más propiedades deseadas tales como mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, mejores propiedades biológicas antagonistas o agonísticas (según sea el caso), reducción de inmunogenicidad, etc. La presente descripción comprende las proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos o CAR, obtenidos en esta forma general.

La presente descripción también incluye proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos monoclonales anti-HLA-A2:NY-ESO-1 completamente humanos o fragmentos de unión al antígeno de estos o CAR que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la CDR, la HCVR y/o la LCVR descritas en la presente con una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que tienen secuencias de aminoácidos de la CDR, la HCVR y/o la LCVR con, p. ej., 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones conservadoras de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la CDR, la HCVR y/o la LCVR descritas en la presente.

La expresión «anticuerpo humano», tal como se usa en la presente, pretende incluir anticuerpos con regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos (mAb, por sus siglas en inglés) de la descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica al sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en la CDR3. Sin embargo, la expresión «anticuerpo humano», como se usa en la presente, no pretende incluir mAb en los que las secuencias de CDR derivadas de líneas germinales de otra especie de mamífero (p. ej., ratón) fueron injertadas en secuencias FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos de forma recombinante en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. La expresión no pretende incluir anticuerpos

aislados de un sujeto humano o generados en este.

La expresión «recombinante», tal como se utiliza en la presente, se refiere a proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, de la descripción creada, expresada, aislada u obtenida por las tecnologías o métodos conocidos en la técnica como tecnología de ADN recombinante que incluye, p. ej., corte y empalme de ADN y expresión transgénica. La expresión se refiere a proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos expresados en un mamífero no humano (lo que incluye mamíferos no humanos transgénicos, p. ej., ratones transgénicos) o un sistema de expresión celular (p. ej., células CHO) o aislado de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes.

Tal como se usa en la presente, las expresiones «receptor de antígeno quimérico» o «CAR», que se usan de manera indistinta en la presente, se refieren a una proteína fusionada recombinante que comprende un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno (p. ej., un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presente en HLA-A2, p. ej., un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 de NY-ESO-1), un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular.

Una «célula efectora inmune», tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier célula del sistema inmunológico con una o más funciones efectoras (p. ej., actividad de destrucción de células citotóxicas, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC). En una modalidad, las células efectoras inmunes usadas con los CAR como se describen en la presente, son linfocitos T, en particular, linfocitos T citotóxicos (CTL; linfocitos T CD8+) y linfocitos T auxiliares (HTL; linfocitos T CD4+). Otras poblaciones de linfocitos T también son útiles en la presente, por ejemplo, linfocitos T sin tratamiento y linfocitos T de memoria. Como observará el experto en la técnica, también se pueden utilizar otras células como células efectoras inmunes con los CAR como se describe en la presente. En particular, las células efectoras inmunes también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos y macrófagos. Las células efectoras inmunes también incluyen progenitores de células efectoras en donde se puede inducir dichas células progenitoras para diferenciarse en células efectoras inmunes *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, en este contexto, las células efectoras inmunes incluyen progenitores de células efectoras inmunes tales como células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) contenidas en la población CD34+ de células derivadas de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica movilizada que, luego de administrarse a un sujeto, se diferencian en células efectoras inmunes maduras o cuya diferenciación en células efectoras inmunes maduras se puede inducir *in vitro*.

Como se describe en la presente, la expresión «péptido fuera de la diana» se refiere a un péptido que difiere en 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos de un péptido diana (p. ej., péptido de NY-ESO-1_157-

165). En determinadas modalidades, la expresión incluye un péptido que difiere en menos de o igual a 3 aminoácidos que el péptido diana. Por ejemplo, para un péptido de 9-mer, si 2, 3 o 4 aminoácidos no son idénticos al péptido diana, se considera un péptido «fuera de la diana». En determinadas modalidades, la identidad de aminoácido se expresa en términos de «grado de similitud» (DoS, por sus siglas en inglés). Si 6 aminoácidos dentro de un péptido de 9-mer son idénticos, el DoS es 6. En determinadas modalidades, un péptido con DoS ≤ 6 se considera un péptido «fuera de la diana». La expresión péptido «fuera de la diana» también se refiere a un péptido que es similar al péptido diana en función de homología de secuencia, se prevé que se une a HLA-A2 y está comprendido en una proteína que se expresa en tejidos normales esenciales.

Las expresiones «se une específicamente» o «se une específicamente a», o similares, significan que una proteína de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este o CAR, forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación de equilibrio de al menos alrededor de $1x10^{-8}$ M o menos (p. ej., una K_D menor indica una unión más fuerte). Son conocidos en la técnica métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmones superficiales y similares. Como se describe en la presente, se han identificado mediante resonancia de plasmones superficiales, p. ej., BIACORE™, proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, que se unen específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presentado por HLA-A2, p. ej., un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 del NY-ESO-1.

La expresión proteína de unión al antígeno de «alta afinidad», p. ej., anticuerpo, se refiere a aquellas proteínas de unión al antígeno, p. ej., mAb, que tienen una afinidad de unión con el epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2, p. ej., un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 del NY-ESO-1, expresado como K_D, de al menos 10^{-8} M; preferentemente 10^{-9} M; más preferentemente 10^{-10} M, aún más preferentemente 10^{-11} M, aún más preferentemente 10^{-12} M, según se midió mediante resonancia de plasmones superficiales, p. ej., BIACORE™ o ELISA de afinidad en solución.

Las expresiones «velocidad de disociación baja», «Koff» o «kd» significan una proteína de unión al antígeno que se disocia de HLA-A2:NY-ESO-1, con una constante de velocidad de 1×10^{-3} s^{-1} o menos, preferentemente de 1×10^{-4} s^{-1} o menos, tal como se determina mediante resonancia de plasmones superficiales, p. ej., BIACORE™.

Las expresiones «parte de unión al antígeno» de una proteína de unión al antígeno (p. ej., un anticuerpo), «fragmento de unión al antígeno» de una proteína de unión al antígeno (p. ej., un

anticuerpo) y similares, tal como se usan en la presente, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que puede ser obtenido enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Las expresiones «fragmento de unión al antígeno» de un anticuerpo, o «fragmento de anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse a un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2, p. ej., un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 del NY-ESO-1 acoplado con HLA-A2.

En modalidades específicas, las proteínas de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo o CAR de la descripción pueden conjugarse con un resto tal como un ligando, un resto detectable o un resto terapéutico («inmunoconjugado»), tal como una citotoxina, una segunda proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1, un anticuerpo de un antígeno específico del tumor, un fármaco contra el cáncer o cualquier otro resto terapéutico útil para tratar una enfermedad o un trastorno que incluye enfermedad o trastorno asociada al NY-ESO-1, tal como un cáncer positivo para NY-ESO-1.

Una «proteína de unión al antígeno aislada», p. ej., un anticuerpo aislado, como se usa en la presente, pretende referirse a una proteína de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo, sustancialmente libre de otras proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos (Ab), que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a HLA-A2:NY-ESO-1, o un fragmento de este, sustancialmente libre de proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, que se une específicamente a antígenos que no sean un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2.

La expresión «resonancia de plasmones superficiales», tal como se usa en la presente, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína en una matriz de biosensor, por ejemplo, con el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ).

Se pretende que el término «K_D», tal como se usa en la presente, se refiera a la constante de equilibrio de disociación de una interacción proteína de unión al antígeno-antígeno particular.

La expresión «compite de forma cruzada», como se utiliza en la presente, significa que una proteína de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este, se une a un antígeno e inhibe o bloquea la unión de otra proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. La expresión también incluye competición entre dos proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, en ambas orientaciones, es decir, una

primera proteína de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo, que se une y bloquea la unión de una segunda proteína de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo y viceversa. En determinadas modalidades, la primera proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, y la segunda proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, se pueden unir al mismo epítopo. De manera alternativa, la primera y segunda proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, pueden unirse a epítopos diferentes, pero superpuestos de tal que la unión de uno inhibe o bloquea la unión del segundo, p. ej., mediante impedimento estérico. La competencia cruzada entre proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un ensayo de interferometría de biocapa sin etiquetas en tiempo real. La competencia cruzada entre dos proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, se puede expresar como la unión de la segunda proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, que es menos que la señal de fondo debido a la unión con sí misma (en donde la primera y segunda proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, son la misma proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo). La competencia cruzada entre 2 proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, se puede expresar, por ejemplo, como % de unión de la segunda proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, que es menor que la referencia de unión de fondo con si misma (en donde la primera y segunda proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, son la misma proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo).

Cuando hacen referencia a un ácido nucleico o a un fragmento de este, las expresiones «identidad sustancial» o «sustancialmente idéntico» indican que cuando se alinea en forma óptima con inserciones o eliminaciones adecuadas de nucleótidos con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos alrededor del 90 % o más, y más preferiblemente al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, tal como se mide mediante cualquier algoritmo de identidad de secuencia conocido, tal como se describe más adelante. Una molécula de ácido nucleico con identidad sustancial respecto a una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en determinadas circunstancias, codificar un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos o una secuencia sustancialmente similar que la del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

La identidad de secuencia se puede calcular usando un algoritmo, por ejemplo, el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch 1970, *J. Mol. Biol*. 48: 443-453) para la alineación global, o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman 1981, *J. Mol Biol.* 147: 195-197) para la alineación local. Dufresne et ál describen otro algoritmo preferido en *Nature Biotechnology* en 2002 (vol. 20, págs. 1269-71) y se usa en el software GenePAST (GQ Life Sciences, Inc. Boston, MA).

Tal como se utiliza con respecto a polipéptidos, las expresiones «similitud sustancial» o «sustancialmente similar» significan dos secuencias de péptidos que, cuando se alinean en forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT con pesos de huecos por defecto, comparten al menos 90 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Una «sustitución conservadora de aminoácidos» es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye con otro residuo de aminoácido que presenta una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí en sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregirse en vista de la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son conocidos por los expertos en la técnica. Ver, p. ej., Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, que se incorpora a la presente mediante esta referencia. Los ejemplos de grupos aminoácidos que presentan cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxi-alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos que se prefieren son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz PAM250 de probabilidad logarítmica que se describe en Gonnet *et ál*. (1992) *Science* 256: 1443 45, incorporado a la presente mediante esta referencia. Un reemplazo «moderadamente conservador» es cualquier cambio con un valor no negativo en la matriz PAM250 de probabilidad logarítmica.

Normalmente, la similitud de secuencias de polipéptidos se mide con software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas utiliza medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones que incluyen sustituciones conservadoras de aminoácidos para encontrar secuencias similares. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT que pueden ser utilizados con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia de polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos, o entre

una proteína de tipo salvaje y una mutante de ella. Ver, p. ej., GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también pueden compararse con FASTA, un programa en GCG versión 6.1, con parámetros por defecto o recomendados. FASTA (p. ej., FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre las secuencias de búsqueda y consulta (Pearson (2000) supra). Las secuencias también se pueden comparar utilizando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman utilizando una búsqueda de huecos afines con una penalización por apertura de huecos de 12 y una penalización por extensión de huecos de 2, matriz BLOSUM de 62. Otro algoritmo preferido al comparar una secuencia de esta descripción con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, con parámetros por defecto. Ver, p. ej., Altschul *et ál.* (1990) *J. Mol. Biol*. 215: 403-410 y (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, cada uno de los cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia.

La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad que produce el efecto deseado para el cual se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento y la determinará el experto en la técnica mediante técnicas conocidas (ver, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Tal como se utiliza en la presente, el término «sujeto» se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, que necesita la mejora, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad o un trastorno asociado con NY-ESO-1, tal como un cáncer asociado con NY-ESO-1 (p. ej., un cáncer positivo para NY-ESO-1). El término incluye sujetos humanos que padecen una enfermedad o trastorno asociado con NY-ESO-1 o que tienen riesgo de padecerlo, tal como un cáncer asociado con NY-ESO-1 o un cáncer asociado con NY-ESO-1 metastásico.

Tal como se utiliza en la presente, «fármaco contra el cáncer» significa cualquier agente útil para tratar o mejorar o inhibir el cáncer, lo que incluye, de manera no taxativa, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimitóticos, procarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, corticosteroides, ciclofosfamida, mitotano (O,P′-(DDD)), productos biológicos (p. ej., anticuerpos e interferones) y agentes radioactivos. Tal como se utiliza en la presente, «una citotoxina o un agente citotóxico» también se refiere a un agente quimioterapéutico y significa cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen Taxol® (paclitaxel), temozolamida, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, cisplatino, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina

y análogos u homólogos de estos.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «fármaco antiviral» se refiere a cualquier fármaco o terapia usada para tratar, prevenir o mejorar una infección en un sujeto hospedador. La expresión «fármaco antiviral» incluye, de modo no taxativo, zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina, analgésicos y corticosteroides.

Un inmunógeno que comprende cualquiera de los siguientes se puede usar para generar proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, para un epítopo conformacional de un péptido NY-ESO-1 presentado por HLA-A2, p. ej., un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 de NY-ESO-1 enlazado a HLA-A2. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, de la descripción pueden obtenerse de ratones inmunizados con una proteína de NY-ESO-1 natural de longitud completa (ver, n.º de acceso de GenBank NP_001318.1) (SEQ ID NO: 271) o un péptido de NY-ESO-1 recombinante (p. ej., un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 (SLLMWITQC; SEQ ID NO: 269) con el n.º de acceso de GenBank NP_001318.1 (SEQ ID NO: 271) o esa secuencia con una sustitución de C165V (SLMMWITQV; SEQ ID NO: 270) del acceso de GenBank, unido a una proteína HLA, tal como HLA-A2.

De manera alternativa, puede producirse NY-ESO-1 o un fragmento de este usando técnicas bioquímicas convencionales y modificarse en el contexto de HLA-A2 y se usa como un inmunógeno.

En algunas modalidades, el inmunógeno puede ser un péptido de NY-ESO-1 recombinante (que puede ser un péptido de NY-ESO-1 recombinante presentado por un HLA) expresado en *E. coli* o en cualquier otra célula eucariota o de mamífero tal como células de ovarios de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés).

En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2 pueden preparase usando los polipéptidos descritos anteriormente o fragmentos de estos. En algunas modalidades, un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2 puede extenderse más allá de las regiones designadas en alrededor de 5 a alrededor de 20 residuos de aminoácidos de cualquiera de los extremos N o C, o ambos, de las regiones descritas en la presente. En determinadas modalidades, cualquier combinación de las regiones antes mencionadas o fragmentos de estas puede ser utilizada en la preparación de proteínas de unión al antígeno específicas para HLA-A2:NY-ESO-1, p. ej., anticuerpos.

Los péptidos se pueden modificar para incluir la adición o la sustitución de determinados residuos para etiquetar o con el fin de conjugarse con moléculas portadoras, tales como KLH. Por ejemplo,

se puede agregar una cisteína en el extremo N o el extremo C de un péptido, o se puede agregar una secuencia enlazadora para preparar el péptido para la conjugación con, por ejemplo, KLH para la inmunización.

Los ensayos *in vitro* de ejemplo no taxativos para medir la actividad de unión están ilustrados en Ejemplos de la presente. En el Ejemplo 3, se determinaron las afinidades de unión y las constantes cinéticas de proteínas de unión al antígeno específicas de anti-HLA-A2:NY-ESO-1 humano, p. ej., anticuerpos, mediante resonancia de plasmones superficiales y las mediciones se llevaron a cabo en un instrumento Biacore 4000 o T200. El Ejemplo 4 describe la unión de los anticuerpos a células que sobreexpresan fragmentos del NY-ESO-1.

Las proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos, específicas para HLA-A2:NY-ESO-1 pueden no contener restos o etiquetas adicionales o pueden contener un resto o etiqueta de extremo C o extremo N. En una modalidad, la etiqueta o el resto es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de una etiqueta (si la hubiere) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie a la que está unido el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina de extremo N se orientará de tal manera que la parte de extremo C del péptido se encuentre distal a la superficie. En una modalidad, la etiqueta puede ser un radionúclido, una tinta fluorescente o una etiqueta detectable con IRM. En determinadas modalidades, tales proteínas de unión al antígeno etiquetadas se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico que incluyen ensayos de imagenología.

Proteínas de unión al antígeno

La presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que incluyen anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos y CAR (p. ej., moléculas de ácido nucleico que codifican un CAR de la descripción) (descritos a continuación). A menos que se indique específicamente lo contrario, debe entenderse que el término «anticuerpo», tal como se usa en la presente, abarca moléculas de anticuerpo que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, «moléculas de anticuerpo completas»), así como fragmentos de unión al antígeno de estas. Las expresiones «parte de unión al antígeno» de un anticuerpo, «fragmento de unión al antígeno» de un anticuerpo y similares, tal como se usan en la presente, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, que puede ser obtenido enzimáticamente, sintético o genéticamente modificado que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Las expresiones «fragmento de unión al antígeno» de un anticuerpo o «fragmento de anticuerpo», tal como se usan en la presente, hacen referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2. Una proteína de unión al

antígeno, tal como un fragmento de anticuerpo, puede incluir un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento que contiene una CDR o una CDR aislada. Las proteínas de unión al antígeno, tal como fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo, pueden derivarse, p. ej., de moléculas de anticuerpo completas mediante cualquier técnica habitual adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de modificación genética recombinante que implican la manipulación y la expresión de ADN que codifica dominios variables y (opcionalmente) constantes de anticuerpos. Dicho ADN se conoce y/o se encuentra fácilmente disponible en, p. ej., fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, p. ej., bibliotecas de anticuerpos-fagos), o puede sintetizarse. Es posible secuenciar y manipular el ADN químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios constantes y/o variables en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

Los ejemplos no taxativos de fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')2; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadena simple (scFv); (vi) fragmentos dAb y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (p. ej., una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado. Otras moléculas modificadas, tales como los anticuerpos específicos del dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominios eliminados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados en CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (p. ej., nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP, por sus siglas en inglés) y dominios IgNAR variables de tiburón también están comprendidas en la expresión «fragmento de unión al antígeno» tal como se usa en la presente.

Normalmente, un fragmento de unión al antígeno de una proteína de unión al antígeno (p. ej., un anticuerpo) comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y, por lo general, comprenderá al menos una CDR que se encontrará junto a una o más secuencias de marco o enmarcada con ellas. En proteínas de unión al antígeno con un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L se pueden ubicar uno respecto a otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener los dímeros V_H - V_H, V_H - V_L o V_L - V_L. De manera alternativa, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio monomérico V_H o V_L.

En determinadas modalidades, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable enlazado de forma covalente a al menos un dominio

constante. Los ejemplos no taxativos de configuraciones de dominios variables y constantes que pueden encontrarse en un fragmento de unión al antígeno de una proteína de unión al antígeno de la presente descripción incluyen: (i) V_H -C_H1; (ii) V_H - C_H2; (iii) V_H - C_H3; (iv) V_H - C_H1- C_H2; (v) V_H - C_H1- C_H2- C_H3; (vi) V_H - C_H2- C_H3; (vii) V_H -C_L; (viii) V_L -C_H1; (ix) V_L -C_H2; (x) V_L -C_H3; (xi) V_L -C_H1-C_H2; (xii) V_L -C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L - C_H2-C_H3; y (xiv) V_L -C_L. En cualquier configuración de dominios variables y constantes que incluyen cualquiera de las configuraciones de ejemplo mencionadas anteriormente, los dominios constantes y variables pueden enlazarse directamente entre sí o pueden enlazarse mediante una región enlazadora o bisagra parcial o completa. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (p. ej., 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, lo que resulta en un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente descripción puede comprender un homodímero o un heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante mencionadas anteriormente en asociación no covalente con otro y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (p. ej., mediante uno o más enlaces disulfuro).

Tal como con moléculas de anticuerpo completas, las proteínas de unión al antígeno, p. ej., los fragmentos de unión al antígeno, pueden ser monoespecíficas o multiespecíficas (p. ej., biespecíficas). Normalmente, un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de un anticuerpo comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno independiente o a un epítopo diferente del mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, que incluye los ejemplos de formatos de anticuerpo biespecíficos descritos en la presente, puede ser adaptado para ser utilizado en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente descripción mediante técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

Preparación de proteínas de unión al antígeno

Los métodos para generar proteínas de unión al antígeno, tal como anticuerpos humanos, en ratones transgénicos son conocidos en la técnica. Se puede usar cualquier método conocido en el contexto de la presente descripción para elaborar anticuerpos humanos que se unen específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (péptido de NY-ESO-1) presentado por HLA-A2.

Usando VELOCIMMUNE® (ver, por ejemplo, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos monoclonales, se aíslan inicialmente proteínas de unión al antígeno de alta afinidad, p. ej., anticuerpos quiméricos, de un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1

presentado por HLA-A2, que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología de VELOCIMMUNE® involucra la generación de un ratón transgénico con un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y cadena ligera humanas enlazadas en forma operativa a los loci de región constante de ratón endógena de forma tal que el ratón produce una proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. Se aísla el ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se enlaza en forma operativa al ADN que codifica las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera humanas. Entonces, se expresa el ADN en una célula capaz de expresar el anticuerpo humano total.

Por lo general, se expone a un ratón VELOCIMMUNE® al antígeno de interés y se recuperan células linfáticas (tales como linfocitos B) de los ratones que expresan proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos. Las células linfáticas pueden fusionarse a una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales y tales líneas celulares de hibridoma son analizadas y seleccionadas para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. Es posible aislar el ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera y enlazarlo a las regiones constantes isotípicas deseadas de la cadena pesada y la cadena ligera. Tal proteína de unión al antígeno puede ser producida en una célula, tal como una célula CHO. De manera alternativa, es posible aislar el ADN que codifica las proteínas de unión al antígeno específicas del antígeno, p. ej., anticuerpos quiméricos, o los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas directamente de los linfocitos específicos para el antígeno.

Inicialmente, se aíslan las proteínas de unión al antígeno de alta afinidad, p. ej., anticuerpos quiméricos, con una región variable humana y una región constante de ratón. Tal como en la sección experimental más adelante, las proteínas de unión al antígeno se caracterizan y se seleccionan según características deseadas que incluyen afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar las proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpos completamente humanos, de la descripción, por ejemplo, IgG1 o IgG4 modificada de tipo salvaje. Aunque la región constante seleccionada puede variar conforme al uso específico, las características de unión al antígeno con afinidad elevada y de especificidad de diana se encuentran en la región variable.

Bioequivalentes

Las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción comprenden proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las proteínas de unión al antígeno

descritas, p. ej., anticuerpos, pero que retienen la capacidad de unirse a un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2. Dichas proteínas de unión al antígeno variantes comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de las proteínas de unión al antígeno descritas. De igual manera, las secuencias de ADN que codifican proteínas de unión al antígeno de la presente descripción comprenden secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos cuando se comparan a la secuencia descrita, pero que codifican una proteína de unión al antígeno que es esencialmente bioequivalente a una proteína de unión al antígeno de la descripción.

Se considera que dos anticuerpos o proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y alcance de absorción no muestran una diferencia considerable cuando se administran a la misma dosis molar en las mismas condiciones experimentales, ya sea en dosis simple o en dosis múltiples. Algunas proteínas de unión al antígeno o anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de absorción, pero no en la tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para el logro de concentraciones corporales efectivas del fármaco en, p. ej., uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacéutico en particular estudiado.

En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno (o anticuerpos) son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza o potencia.

En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno (o anticuerpos) son bioequivalentes si un paciente puede cambiar una o más veces del producto de referencia al producto biológico sin un aumento previsto en el riesgo de efectos secundarios que incluyen un cambio clínicamente significativo en inmunogenicidad o una reducción de eficacia en comparación con terapia continuada sin dicho cambio.

En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno (o anticuerpos) son bioequivalentes si ambas actúan mediante uno o más mecanismos de acción comunes para la o las condiciones de uso, en la medida en que se conozcan dichos mecanismos.

La bioequivalencia se puede demostrar a través de métodos *in vivo* y/o *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en la que se mide la concentración de la proteína de unión al antígeno o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado con los datos de biodisponibilidad humana *in vivo* y es razonablemente

predictivo de ellos; (c) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en la que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado de la proteína de unión al antígeno (o su diana) en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, la eficacia o la biodisponibilidad o la bioequivalencia de una proteína de unión al antígeno.

Las variantes bioequivalentes de las proteínas de unión al antígeno (o anticuerpos) de la descripción se pueden construir, por ejemplo, realizando diversas sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos o secuencias del extremo o internos que no son necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína no esenciales para la actividad biológica se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramolecular innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, las proteínas de unión al antígeno bioequivalentes pueden incluir variantes de la proteína de unión al antígeno que comprenden cambios de aminoácidos, los cuales modifican las características de glicosilación de las proteínas de unión al antígeno, p. ej., mutaciones que eliminan la glicosilación.

Proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden variantes de Fc

De acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, se proporcionan proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1, p. ej., anticuerpos, que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que mejoran o disminuyen la unión de proteína de unión al antígeno al receptor de FcRn, p. ej., a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, donde la o las mutaciones aumentan la afinidad del dominio Fc con FcRn en un entorno ácido (p. ej., en un endosoma donde el pH oscila de alrededor de 5.5 a alrededor de 6.0). Dichas mutaciones pueden dar como resultado un aumento en la semivida sérica de la proteína de unión al antígeno cuando se administra a un animal. Los ejemplos no taxativos de tales modificaciones de Fc incluyen, p. ej., una modificación en la posición 250 (p. ej., E o Q); 250 y 428 (p. ej., L o F); 252 (p. ej., L/Y/F/W o T), 254 (p. ej., S o T), y 256 (p. ej., S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (p. ej., H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (p. ej., A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (p. ej. 308F, V308F), y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación de 428L (p. ej., M428L) y de 434S (p. ej., N434S); una modificación de 428L, 259I (p. ej., V259I) y 308F (p. ej., V308F); una modificación de 433K (p. ej., H433K) y una de 434 (p. ej., 434Y); una modificación de 252, 254 y 256 (p. ej., 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (p. ej., T250Q y M428L); y una modificación de 307 y/o 308 (p. ej., 308F o 308P). En aun otra modalidad, la

modificación comprende una modificación de 265A (p. ej., D265A) y/o 297A (p. ej., N297A).

Por ejemplo, la presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones que se seleccionan del grupo que consiste en: 250Q y 248L (p. ej., T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (p. ej., M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (p. ej., M428L y N434S); 257I y 311I (p. ej., P257I y Q311I); 257I y 434H (p. ej., P257I y N434H); 376V y 434H (p. ej., D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (p. ej., T307A, E380A y N434A); y 433K y 434F (p. ej., H433K y N434F). En una modalidad, la presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden un dominio Fc que comprende una mutación S108P en la región bisagra de IgG4 para promover la estabilización de dímeros. Todas las combinaciones posibles de las mutaciones de dominio Fc que preceden y otras mutaciones dentro de los dominios variables de la proteína de unión al antígeno descritas en la presente memoria se contemplan dentro del alcance de la presente descripción.

La presente descripción también incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que comprenden una región constante de cadena pesada quimérica (C_H) donde la región quimérica C_H comprende segmentos derivados de las regiones de C_H de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, las proteínas de unión al antígeno de la descripción pueden comprender una región de C_H quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio C_H2 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinado con parte o la totalidad de un dominio de C_H3 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. De acuerdo con determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno de la descripción comprenden una región C_H quimérica que tiene una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos de «bisagra superior» (residuos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración de la UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con una secuencia de «bisagra inferior» (residuos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración de UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. De acuerdo con determinadas modalidades, la región bisagra quimérica comprende residuos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de IgG1 humana o IgG4 humana y residuos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior de IgG2 humana. Una proteína de unión al antígeno que comprende una región C_H quimérica como se describe en la presente puede, en determinadas modalidades, presentar funciones efectoras de Fc modificadas sin afectar negativamente las propiedades farmacocinéticas o terapéuticas de la proteína de unión al antígeno. (Ver, p. ej., la publicación de patente estadounidense n.º 20140243504, cuya

descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

Características biológicas de las proteínas de unión al antígeno

En general, las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción funcionan al unirse a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presentado por HLA.

La presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que se unen al péptido de NY-ESO-1 en el contexto de HLA-A2 con alta especificidad. Las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 no se unen al péptido de NY-ESO-1 en ausencia de HLA-A2. Además, las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 no se unen a un péptido fuera de la diana en el contexto de HLA-A2.

La presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que se unen a un HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 (157-165) monomérico (en donde el péptido de NY-ESO-1 157-165 puede comprender C165 o V165; es decir, las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción pueden ser específicas para cualquiera de estas formas o no específicas con respecto a cuál forma) con alta afinidad. Por ejemplo, la presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno que se unen a HLA-A2:péptido 157-165 monomérico (opcionalmente con la sustitución de C165V) (p. ej., a 25 ºC o a 37 ºC) con una K_D inferior a alrededor de 1 nM, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales, p. ej., utilizando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 3 de la presente. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno se unen a HLA-A2:péptido de NY-ESO-1_157-165 monomérico con una K_D inferior a alrededor de 1 nM, inferior a alrededor de 0.5 nM, inferior a alrededor de 0.1 nM, inferior a alrededor de 0.05 nM o inferior a alrededor de 0.04 nM, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales, p. ej., utilizando el formato de ensayo que se define en el Ejemplo 3 de la presente o un ensayo sustancialmente similar.

La presente descripción también incluye proteínas de unión al antígeno que se unen a una célula que expresa un complejo HLA-A2:NY-ESO-1:péptido 157-165 (en donde el péptido 157-165 de NY-ESO-1 puede comprender C165 o V165; es decir, las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción pueden ser específicas para cualquiera de las formas o no específicas con respecto a qué forma) con una EC_{50} inferior a alrededor de 10 nM y no se unen a células que expresan péptidos fuera de la diana previstos según se determina mediante un ensayo de citometría de flujo, como se define en los Ejemplos 4 y 5 de la presente, o un ensayo sustancialmente similar. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno se unen a una célula que expresa un HLA-A2:péptido de NY-ESO-1_157-165 con una EC_{50} inferior a alrededor de 10 nM, inferior a alrededor de 5 nM, inferior a alrededor de 2 nM, inferior a alrededor

de 1 nM o inferior a alrededor de 0.5 nM, y no se unen a células que expresan péptidos fuera de la diana previstos según se determina mediante un ensayo de citometría de flujo, como se define en los Ejemplos 4 y 5 de la presente, o un ensayo sustancialmente similar p. ej., usando el formato de ensayo de los Ejemplos 4 y 5 en la presente o un ensayo sustancialmente similar.

En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción son útiles para inhibir el crecimiento de un tumor o retrasar la evolución de cáncer cuando se administra de manera profiláctica a un sujeto que lo necesita y pueden aumentar la supervivencia del sujeto. Por ejemplo, la administración de una proteína de unión al antígeno de la presente descripción puede conducir a la reducción de un tumor primario y puede prevenir la metástasis o el desarrollo de tumores secundarios. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción son útiles para inhibir el crecimiento de un tumor cuando se administra de manera terapéutica a un sujeto que lo necesita y pueden aumentar la supervivencia del sujeto. Por ejemplo, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión al antígeno de la descripción a un sujeto puede llevar a la reducción y desaparición de un tumor establecido en el sujeto.

En una modalidad, la descripción proporciona una proteína de unión al antígeno recombinante aislada de esta que se une a un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2, en donde la proteína de unión al antígeno exhibe una o más de las siguientes características: (i) comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 180, 196, 211 y 230, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 186, 203, 219 y 238, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; (iii) comprende un dominio de la HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217 y 236, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos

84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de la LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224 y 244, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; (iv) comprende un dominio de la HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213 y 232, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de la HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 215 y 234, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; un dominio de la LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221 y 240, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; y un dominio de la LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174 y 242, o una secuencia sustancialmente similar de esta que tiene al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia; (v) se une al complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165 (C165 o

V165) monomérico con una constante de equilibrio de disociación (KD) de unión inferior a alrededor de 1 nM según se mide en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales a 25 °C; (vi) se une al complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165 (C165 o V165) monomérico con una constante de equilibrio de disociación (KD) de unión inferior a alrededor de 1 nM según se mide en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales a 25 °C; (vii) se une a las células que expresan el complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165 (C165 o V165) con una EC_{50} inferior a alrededor de 10 nM; y (viii) no se une al péptido fuera de la diana presente en HLA-A2 en donde el péptido difiere en 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 271.

Las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción pueden poseer una o más de las características biológicas mencionadas anteriormente, o cualquier combinación de estas. Otras características biológicas de las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción serán evidentes para un experto en la técnica a partir de una revisión de la presente descripción que incluye los Ejemplos funcionales de la presente.

Mapeo de epítopos y tecnologías relacionadas

La presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de uno o más dominios del péptido de NY-ESO-1 presente en HLA-A2. El epítopo puede consistir en múltiples aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) ubicados dentro de una o ambos de los dominios antes mencionadas de la molécula de NY-ESO-1 (p. ej., un epítopo conformacional).

Se pueden utilizar diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica para determinar si una proteína de unión al antígeno «interactúa con uno o más aminoácidos» dentro de un polipéptido o una proteína. Los ejemplos de técnicas incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en *Antibodies*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Otros métodos incluyen análisis mutacional de escaneo de alanina, análisis de péptidos mediante transferencia (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), análisis de péptidos por escisión, estudios cristalográficos y análisis de NMR. Además, se pueden utilizar métodos como la escisión de epítopos, la extracción de epítopos y la modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Otro método que se puede utilizar para identificar los aminoácidos de un polipéptido con el que interactúa una proteína de unión al antígeno es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado mediante espectrómetro de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica marcar la proteína de interés con deuterio, y luego unir la proteína de unión al antígeno a la proteína marcada con deuterio. Luego, el complejo de proteína/proteína de unión al antígeno se transfiere a agua y los protones intercambiables dentro de aminoácidos protegidos por el complejo de proteína de unión

al antígeno se someten a un intercambio inverso de deuterio a hidrógeno a una tasa más lenta que los protones intercambiables de aminoácidos que no son parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz proteína/proteína de unión al antígeno pueden retener el deuterio y así presentar una masa relativamente más alta en comparación con los aminoácidos que no se incluyen en la interfaz. Después de la disociación de la proteína de unión al antígeno, la proteína diana se somete a escisión por proteasa y análisis de espectrometría de masas para revelar así los residuos etiquetados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los cuales interactúa la proteína de unión al antígeno. Ver, p. ej., Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

El término «epítopo» se refiere a un sitio en un antígeno al cual responden linfocitos B y/o T. Los epítopos de linfocitos B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen tras la exposición a solventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con solventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye típicamente al menos 3, y más usualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

La determinación de perfiles asistida por modificaciones (MAP, por sus siglas en inglés), conocida también como determinación de perfiles de anticuerpos con base en estructuras de antígenos (ASAP, por sus siglas en inglés) es un método que clasifica grandes números de proteínas de unión al antígeno monoclonales, p. ej., anticuerpos (mAb), que se dirigen al mismo antígeno conforme a las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a superficies de antígenos modificadas química o enzimáticamente (ver US 2004/0101920, específicamente incorporada a la presente mediante esta referencia en su totalidad). Cada categoría puede reflejar un epítopo único ya sea claramente diferente de un epítopo que se representa en otra categoría, o que se superpone parcialmente con él. Esta tecnología permite filtrar rápidamente las proteínas de unión al antígeno que son genéticamente idénticas, de manera que la caracterización pueda concentrarse en las proteínas de unión al antígeno genéticamente diferentes. Cuando se aplica a la identificación de hibridoma, la MAP puede facilitar la identificación de clones de hibridomas poco comunes que producen proteínas de unión al antígeno con las características deseadas. Se puede utilizar MAP para clasificar las proteínas de unión al antígeno de la descripción en grupos de proteínas de unión al antígeno que se unen a epítopos diferentes.

La presente descripción incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que se unen al mismo epítopo o a una parte del epítopo, como cualquiera de las proteínas de unión al antígeno específicas de ejemplo descritas en la presente en la Tabla 1, o una proteína de unión al

antígeno que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de las proteínas de unión al antígeno de ejemplo descritas en la Tabla 1. Asimismo, la presente descripción también incluye proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que compiten por unión a HLA-A2:NY-ESO-1 o un fragmento de este con cualquiera de las proteínas de unión al antígeno específicas de ejemplo descritas en la presente en la Tabla 1, o una proteína de unión al antígeno que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de las proteínas de unión al antígeno de ejemplo descritas en la Tabla 1.

Se puede determinar con facilidad si una proteína de unión al antígeno se une al mismo epítopo que, o compite por unión con, una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de referencia mediante métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si una proteína de unión al antígeno de prueba se une al mismo epítopo que una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de referencia de la descripción, se permite que la proteína de unión al antígeno de referencia se una a una proteína o un péptido HLA-A2:NY-ESO-1 en condiciones de saturación. Luego, se evalúa la capacidad de una proteína de unión al antígeno de prueba para unirse a la molécula HLA-A2:NY-ESO-1. Si la proteína de unión al antígeno de prueba puede unirse a HLA-A2:NY-ESO-1 luego de la unión por saturación con la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de referencia, se puede concluir que la proteína de unión al antígeno de prueba se une a un epítopo diferente que la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de referencia. Por otro lado, si la proteína de unión al antígeno de prueba no es capaz de unirse a la proteína HLA-A2:NY-ESO-1 tras la unión por saturación con la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de referencia, entonces la proteína de unión al antígeno de prueba puede unirse al mismo epítopo que el epítopo unido por la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de referencia de la descripción.

Para determinar si una proteína de unión al antígeno compite por la unión con una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se lleva a cabo en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que la proteína de unión al antígeno de referencia se una a una proteína HLA-A2:NY-ESO-1 en condiciones de saturación y luego se evalúa la unión de la proteína de unión al antígeno de prueba a la molécula HLA-A2:NY-ESO-1. En una segunda orientación, se permite que la proteína de unión al antígeno de prueba se una a una molécula HLA-A2:NY-ESO-1 en condiciones de saturación con posterior evaluación de la unión de la proteína de unión al antígeno de referencia a la molécula HLA-A2:NY-ESO-1. Si, en ambas orientaciones, solo la primera proteína de unión al antígeno (saturante) es capaz de unirse a la molécula HLA-A2:NY-ESO-1, entonces se concluye que la proteína de unión al antígeno de prueba y la proteína de unión al antígeno de referencia compiten

por unirse a HLA-A2:NY-ESO-1. Como apreciará un experto en la técnica, una proteína de unión al antígeno que compite por la unión con una proteína de unión al antígeno de referencia puede no necesariamente unirse al epítopo idéntico que la proteína de unión al antígeno de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión de la proteína de unión al antígeno de referencia al unirse a un epítopo superpuesto o adyacente.

Dos proteínas de unión al antígeno se unen al mismo epítopo o al epítopo superpuesto si cada una inhibe competitivamente (bloquea) la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso 1, 5, 10, 20 o 100 veces mayor de una proteína de unión al antígeno inhibe la unión de la otra en al menos un 50 %, pero preferiblemente en un 75 %, 90 % o incluso 99 %, según mediciones realizadas en un ensayo de unión competitiva (ver, p. ej., Junghans *et ál., Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). De manera alternativa, se considera que dos proteínas de unión al antígeno tienen el mismo epítopo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión al antígeno reducen o eliminan la unión de la otra. Dos proteínas de unión al antígeno tienen epítopos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de una proteína de unión al antígeno reducen o eliminan la unión de la otra.

Se pueden realizar experimentos de rutina adicionales (p. ej., análisis de unión y de mutación de péptidos) para confirmar si la falta de unión de la proteína de unión al antígeno de prueba que se observa se debe a la unión al mismo epítopo que la proteína de unión al antígeno de referencia o si un bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Este tipo de experimentos pueden llevarse a cabo mediante ELISA, RIA, resonancia de plasmones superficiales, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión de proteína de unión al antígeno disponible en la técnica.

Inmunoconjugados

La descripción comprende las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 conjugadas con un resto terapéutico («inmunoconjugado»), tal como una citotoxina o un agente quimioterapéutico para tratar el cáncer. Tal como se usa en la presente, el término «inmunoconjugado» hace referencia a una proteína de unión al antígeno que está unida química o biológicamente a una citotoxina, un agente radioactivo, una citocina, un interferón, un resto de direccionamiento o indicador, tal como un resto detectable, una enzima, una toxina, un péptido o una proteína o un agente terapéutico. La proteína de unión al antígeno puede estar unida a la citotoxina, al agente radioactivo, a la citocina, al interferón, al resto de direccionamiento o indicador, a la enzima, a la toxina, al péptido o al agente terapéutico en cualquier ubicación a lo largo de la molécula siempre y cuando la proteína de unión al antígeno sea capaz de unirse a su

diana. Los ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados de proteína de unión al antígeno-fármaco y proteína de unión al antígeno-proteínas de fusión a toxina. En una modalidad, el agente puede ser un segundo anticuerpo diferente de NY-ESO-1 o HLA-A2:NY-ESO-1. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno se puede conjugar con un agente específico para una célula tumoral. El tipo de resto terapéutico que puede conjugarse a la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 y tendrá en cuenta la afección a tratarse y el efecto terapéutico que se busca conseguir. Se conocen en la técnica ejemplos de agentes adecuados para formar inmunoconjugados, ver, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 05/103081.

Receptores de antígeno quimérico (CAR)

Los receptores de antígeno quimérico (CAR) redirigen la especificidad de los linfocitos T hacia los antígenos reconocidos por el anticuerpo que se expresan en la superficie de las células cancerosas, mientras que los receptores de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) extienden el rango de dianas para incluir antígenos tumorales intracelulares. Un CAR redirigido a linfocitos T específicos para el antígeno de diferenciación de linfocitos B CD19 ha demostrado una eficacia notable en el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B, mientras que los linfocitos T redirigidos por TCR han demostrado beneficios en pacientes que sufren de cáncer sólido. Stauss et ál. describen estrategias para modificar CAR y TCR terapéuticos, para su uso en el tratamiento para el cáncer, por ejemplo, para mejorar la función efectora específica del antígeno y limitar la toxicidad de linfocitos T modificados (*Current Opinion in Pharmacology* 2015, 24:113-118).

Un aspecto de la descripción incluye un receptor de antígeno quimérico (CAR) que es específico para un péptido de NY-ESO-1 exhibido en la superficie de células tumorales por parte de HLA-A2, tal como un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 del NY-ESO-1. En una modalidad de la presente descripción, un CAR como se describe en la presente comprende un dominio de unión específico de la diana extracelular, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular (tal como un dominio de señalización derivado de CD3zeta o FcRgamma) y/o uno o más dominios de señalización coestimuladora derivados de una molécula coestimuladora, tal como, de manera no taxativa, CD28, CD137, CD134 o CD278. En una modalidad, el CAR incluye una región espaciadora o bisagra entre el dominio de unión extracelular y el dominio transmembrana, tal como una bisagra de CD8alpha o una bisagra de CD28. En otra modalidad de la presente descripción, un CAR como se describe en la presente comprende un dominio de unión específico de la diana extracelular y un dominio constante del receptor de linfocitos T («construcción de cuerpo T»). En algunas modalidades, un dominio transmembrana/bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 296. En algunas modalidades, una región bisagra comprende una secuencia CD28 de la SEQ ID NO: 305.

En algunas modalidades, un dominio transmembrana comprende una secuencia CD28 de la SEQ ID NO: 304. En algunas modalidades, un dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 297. En algunas modalidades, un dominio coestimulador CD28 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 299. En algunas modalidades, el dominio de señalización CD3zeta comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 298.

Se debe entender que, para su uso en cualquiera de los CAR descritos en la presente, el dominio de unión específico de la diana extracelular puede comprender un Fab, un Fab', un (Fab')2, un Fv, o un Fv de cadena simple (scFv) de una proteína de unión al antígeno de la descripción.

Como se usa en la presente, el dominio de unión o el dominio extracelular de los CAR proporciona el CAR con la capacidad de unirse al antígeno diana de interés. Un dominio de unión puede ser cualquier proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido que posea la capacidad de reconocer y unirse, de manera específica, a una molécula biológica (p. ej., un receptor en la superficie celular o proteína tumoral, o un componente de estos). Un dominio de unión incluye cualquier compañero de unión de origen natural, sintético, semisintético o producido de manera recombinante para una molécula biológica de interés. Por ejemplo, y como se describe de manera adicional en la presente, un dominio de unión puede ser regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo o las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera pueden unirse en una única cadena y en cualquiera de las orientaciones (p. ej., VL-VH o VH-VL). Se conoce una variedad de ensayos para identificar dominios de unión de la presente descripción que se unen específicamente a una diana particular, lo que incluye transferencia Western, ELISA, citometría de flujo o análisis de resonancia de plasmones superficiales (p. ej., usando análisis BIACORE®) y se describen en la presente. La diana puede ser cualquier antígeno de interés clínico contra el cual sería deseable activar una respuesta inmunitaria efectora que da como resultado la eliminación de tumores. En una modalidad, el antígeno diana del dominio de unión del receptor de antígeno quimérico es un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presentado por HLA-A2 en la superficie de células tumorales, tal como un péptido que comprende los residuos de aminoácido 157-165 del NY-ESO-1.

Los dominios de unión ilustrativos incluyen proteínas de unión al antígeno, tal como fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo, tales como scFv, scTCR, dominios extracelulares de los receptores, ligandos para receptores/moléculas de superficie celular o dominios de unión al receptor de estos, y proteínas de unión al tumor. En determinadas modalidades, los dominios de unión al antígeno en un CAR de la descripción pueden ser una región variable (Fv), un CDR, un Fab, un scFv, un VH, un VL, una variante del anticuerpo del dominio (dAb), un anticuerpo de camélido (VHH), una variante de dominio 3 de fibronectina, una variante de repetición de anquirina

y otro dominio de unión específico del antígeno derivado de otros andamiajes de proteína.

En una modalidad, el dominio de unión del CAR es un anticuerpo de cadena simple (scFv) anti-HLA-A2:NY-ESO-1 y puede ser un scFv murino, humano o humanizado. Los anticuerpos de cadena simple se pueden clonar a partir de los genes de la región V de un hibridoma específico para una diana deseada. Una técnica que se puede utilizar para clonar la cadena pesada de la región variable (VH) y la cadena ligera de la región variable (VL) se describió, por ejemplo, en Orlandi et ál., *PNAS*, 1989; 86: 3833-3837. Por lo tanto, en determinadas modalidades, un dominio de unión comprende un dominio de unión derivado del anticuerpo, pero puede ser un dominio de unión no derivado de anticuerpo. Un dominio de unión derivado del anticuerpo puede ser un fragmento de un anticuerpo o un producto modificado genéticamente de uno o más fragmentos del anticuerpo, cuyo fragmento está implicado en la unión con el antígeno.

En determinadas modalidades, los CAR de la presente descripción pueden comprender un enlazador entre los diversos dominios, agregado para la separación y conformación adecuadas de la molécula. Por ejemplo, en algunas modalidades, puede haber un enlazador entre las regiones VH y VL del dominio de unión que pueden tener 1-10 aminoácidos de longitud. En otras modalidades, el enlazador entre cualquiera de los dominios del receptor de antígeno quimérico puede tener entre 1-20 o 20 aminoácidos de longitud. En este sentido, el enlazador puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud. En modalidades adicionales, el enlazador puede tener 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 aminoácidos de longitud. Los intervalos que incluyen los números descritos en la presente también se incluyen en la presente, p. ej., un enlazador con 10-30 aminoácidos de longitud.

En determinadas modalidades, los enlazadores adecuados para su uso en el CAR descrito en la presente son enlazadores flexibles. Los enlazadores adecuados se pueden seleccionar fácilmente y pueden tener cualquier longitud diferente adecuada, tal como de 1 aminoácido (p. ej., Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, que incluye 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos.

Los ejemplos de enlazadores flexibles incluyen polímeros de glicina (G)n, polímeros de glicina-serina (G)nS, donde n es un entero de al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Además, los enlazadores pueden comprender múltiples unidades de las secuencias antes mencionadas, p. ej., ((G)nS)m), en donde n es un entero de al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) y m es un entero de al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). En algunas modalidades, n es 4 y un enlazador comprende la secuencia GGGGS (SEQ ID NO:

295). En algunas modalidades, n es 4 y m es 3, y un enlazador comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 303). Los polímeros de glicina y glicina-serina son relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden tener la capacidad de servir como conector neutro entre dominios de proteínas de fusión, como los CAR descritos en la presente. La glicina accede en un grado significativamente mayor al espacio phi-psi con respecto a como lo hace la alanina y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (ver Scheraga, *Rev. Computational Chem*. 11173-142 (1992)). El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un CAR puede incluir enlazadores que son total o parcialmente flexibles, de modo que el enlazador puede incluir un enlazador flexible, así como una o más partes que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura CAR deseada.

El dominio de unión del CAR puede estar seguido por un «espaciador» o «bisagra», que hace referencia a la región que mueve el dominio de unión al antígeno en sentido opuesto a la superficie de la célula efectora para permitir un contacto correcto entre las células, unión al antígeno y activación (Patel *et ál., Gene Therapy,* 1999; 6: 412-419). La región bisagra en un CAR es generalmente entre la transmembrana (TM) y el dominio de unión. En determinadas modalidades, una región bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina y puede ser una región bisagra de inmunoglobulina de tipo salvaje o una región bisagra de inmunoglobulina de tipo salvaje alterada. Otras regiones bisagra de ejemplo usadas en los CAR descritos en la presente incluyen la región bisagra derivada de las regiones extracelulares de proteínas de membrana de tipo 1 tales como CD8alpha, CD4, CD28 y CD7, que pueden ser regiones bisagra de tipo salvaje de estas moléculas o pueden estar alteradas. En una modalidad, la región bisagra comprende una bisagra CD8alpha.

El dominio o región «transmembrana» es la parte del CAR que ancla la parte de unión extracelular a la membrana plasmática de la célula efectora inmune y facilita la unión del dominio de unión con el antígeno diana. El dominio transmembrana puede ser un dominio transmembrana CD3zeta, sin embargo, otros dominios transmembrana que pueden emplearse incluyen los obtenidos de CD8alpha, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una modalidad, el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de CD137. En determinadas modalidades, el dominio transmembrana es sintético, en cuyo caso comprendería residuos predominantemente hidrofóbicos tales como leucina y valina.

El «dominio de señalización intracelular» hace referencia a la parte de la proteína del receptor de antígeno quimérico que participa en la transducción del mensaje de unión eficaz del CAR a un antígeno diana en el interior de la célula efectora inmunitaria para provocar una función de la célula efectora, p. ej., activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, lo que incluye la liberación de factores citotóxicos a la célula diana unida al CAR u otras respuestas

celulares provocadas por la unión del antígeno al dominio del CAR extracelular. La expresión «función efectora» hace referencia a una función especializada de la célula. La función efectora del linfocito T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o auxiliar o actividad que incluye la secreción de citocinas. Por lo tanto, la expresión «dominio de señalización intracelular» hace referencia a la parte de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige la célula para que realice una función especializada. Si bien generalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar todo el dominio. En la medida en que se utilice una parte trunca de un dominio de señalización intracelular, dicha parte trunca se puede utilizar en lugar de todo el dominio, siempre que transduzca la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier parte trunca del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora. El dominio de señalización intracelular también se conoce como el «dominio de transducción de señales» y típicamente se deriva de partes de cadenas de FcRy o CD3 humanas.

Se sabe que las señales generadas a través del receptor de linfocitos T solo no son suficientes para una activación completa del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígenos a través del receptor de linfocitos T (secuencias de señalización citoplasmática primaria) y aquellas que actúan en una manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmática secundaria). Las secuencias de señalización citoplasmática primaria regulan la activación primaria del complejo del receptor de linfocitos T ya sea de forma inhibidora o mediante inhibición. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria que actúan de manera coestimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como «motivos de activación a base de tirosina de inmunorreceptor» o ITAM (por sus siglas en inglés).

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primaria que se usan particularmente en la descripción incluyen las derivadas de TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En determinadas modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de los CAR anti-HLA-A2:NY-ESO-1 descritos en la presente se derivan de CD3zeta o FcRgamma.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «dominio de señalización coestimuladora» o «dominio coestimulador» hace referencia a la parte del CAR que comprende el dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o receptores Fc que

proporcionan una segunda señal necesaria para la activación y función eficaces de los linfocitos T tras la unión al antígeno. Los ejemplos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 y un ligando que se une específicamente a CD83. Por consiguiente, mientras que la presente descripción proporciona dominios coestimuladores de ejemplo derivados de CD3zeta, CD28, y 4-1BB, se contemplan otros dominios coestimuladores para su uso con los CAR descritos en la presente. La inclusión de uno o más dominios de señalización coestimuladores puede mejorar la eficacia y expansión de los linfocitos T que expresan receptores CAR. Los dominios de señalización intracelulares y de señalización coestimuladores pueden unirse en cualquier orden en tándem al extremo carboxilo terminal del dominio transmembrana.

Aunque se ha demostrado que los CAR basados en scFv modificados para contener un dominio de señalización de CD3 o FcRgamma administran una señal potente para la función efectora y activación de linfocitos T, no son suficientes para suscitar señales que promueven la supervivencia de los linfocitos T y su expansión en ausencia de una señal coestimuladora concomitante. Otros CAR que contienen un dominio de unión, una bisagra, una transmembrana y el dominio de señalización derivado de CD3zeta o FcRgamma junto con uno o más dominios de señalización coestimuladores (p. ej., dominios coestimuladores intracelulares derivados de CD28, CD137, CD134 y CD278) pueden dirigir la actividad antitumoral de manera más eficaz así como aumentar la secreción en citocinas, la actividad lítica, la supervivencia y la proliferación en CAR que expresan linfocitos T *in vitro* y en modelos en animales y pacientes con cáncer (Milone *et ál., Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong *et ál., Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito *et ál., PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

En una modalidad, los CAR de HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción comprenden (a) un scFv anti-HLA-A2:NY-ESO-1 como un dominio de unión (p. ej., un scFv que tiene regiones de unión (p. ej., CDR o dominios variables) de cualesquiera uno o más de los anticuerpos HLA-A2:NY-ESO-1 descritos en la Tabla 1), (b) una región bisagra derivada de CD8alpha humano, (c) un dominio transmembrana de CD8alpha humano y (d) un dominio de señalización intracelular de la cadena CD3 zeta (CD3) del receptor de linfocitos T humanos y, opcionalmente, uno o más dominios de señalización coestimuladora derivados de CD28, CD137, CD134 y CD278. En una modalidad, los diferentes dominios proteicos se disponen del extremo amino a carboxilo en el siguiente orden: dominio de unión, región bisagra y dominio transmembrana. El dominio de señalización intracelular y los dominios de señalización coestimuladora opcionales están enlazados al extremo carboxi transmembrana en cualquier orden en tándem para formar un polipéptido quimérico de cadena simple. En una modalidad, una construcción de ácido nucleico que codifica un CAR de HLA-

A2:NY-ESO-1 es una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes secuencias de codificación, por ejemplo, (5' a 3') las secuencias de codificación de un scFv anti-HLA-A2:NY-ESO-1 humano, una bisagra CD8alpha humana, un dominio transmembrana CD8alpha humano, un dominio coestimulador CD137 y un dominio de señalización intracelular CD3zeta. En otra modalidad, una construcción de ácido nucleico que codifica un CAR de HLA-A2:NY-ESO-1 es una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes secuencias de codificación, por ejemplo, (5' a 3') las secuencias de codificación de un scFv anti-HLA-A2:NY-ESO-1 humano, una bisagra CD8alpha humana, un dominio transmembrana CD8alpha humano, un dominio coestimulador CD137 y un dominio coestimulador CD3zeta. En determinadas modalidades, una construcción de ácido nucleico que codifica un CAR de HLA-A2:NY-ESO-1 es una molécula de ácido nucleico quimérica que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes secuencias de codificación, por ejemplo, (5' a 3') las secuencias de codificación de un scFv anti-HLA-A2:NY-ESO-1 humano, una bisagra CD8alpha humana, un dominio transmembrana CD8alpha humano, un dominio coestimulador CD137 y un dominio coestimulador CD3zeta, en donde el scFv anti-HLA-A2:NY-ESO-1 comprende un V_H que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82, 102, 122, 142, 162, 180, 196, 211, 230 y 250; o donde el scFv anti-HLA-A2:NY-ESO-1 comprende un V_L que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 186, 203, 219, 238 y 258; o en donde el scFv anti-HLA-A2:NY-ESO-1 comprende un par V_H/V_L que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 y 250/258. En algunas modalidades, la presente descripción incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR de HLA-A2:NY-ESO-1 que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la Tabla 2.

En determinadas modalidades, el polinucleótido que codifica el CAR descrito en la presente se inserta en un vector. El término «vector», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un vehículo en el cual un polinucleótido que codifica una proteína puede insertarse de manera covalente para provocar la expresión de esa proteína y/o la clonación del polinucleótido. También es posible hacer referencia a dichos vectores como «vectores de expresión». El polinucleótido aislado puede insertarse en un vector usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, de manera no taxativa, el vector puede digerirse usando enzimas de restricción adecuadas y luego puede ligarse con el polinucleótido aislado que tiene extremos de restricción coincidentes. Los vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar secuencias de ácido nucleico heterólogas o modificadas que codifican al menos parte de un producto génico capaz de

transcribirse en una célula. En la mayoría de los casos, las moléculas de ARN se traducen luego en una proteína. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante operativamente enlazada en un organismo hospedador particular. Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener asimismo secuencias de ácido nucleico que cumplan otras funciones y se describirán más adelante. Un vector de expresión puede comprender elementos adicionales, por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, que le permite, de esta manera, mantenerse en dos organismos, por ejemplo, en células humanas para la expresión y en un hospedador procariota para la clonación y amplificación.

El vector de expresión puede tener los elementos reguladores anteriores 5' y posteriores 3' necesarios tales como secuencias del promotor tales como promotores CMV, PGK y EF1alfa, reconocimiento de ribosomas y caja TATA de unión, y secuencia de terminación de transcripción 3' UTR AAUAAA para la traducción y transcripción génica eficaz en su célula hospedadora respectiva. Otros promotores adecuados incluyen el promotor constitutivo del promotor temprano del virus del simio 40 (SV40), el promotor del virus de tumor mamario en ratones (MMTV, por sus siglas en inglés), promotor LTR de VIH, promotor MoMuLV, promotor del virus de la leucemia aviar, promotor temprano inmediato del EBV y promotor del virus de sarcoma de Rous. También pueden usarse promotores génicos humanos que incluyen, de manera no taxativa, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. En determinadas modalidades, los promotores inducibles también se contemplan como parte de los vectores que expresan el receptor de antígeno quimérico. Esto proporciona un cambio molecular capaz de activar la expresión de la secuencia de polinucleótidos de interés o inactivar la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona o un promotor de tetraciclina.

El vector de expresión puede tener una secuencia adicional tal como etiquetas 6x-histidina (SEQ ID NO:292), c-Myc y FLAG que se incorporan en los CAR expresados. Por lo tanto, el vector de expresión puede modificarse para que contenga secuencias reguladoras no traducidas 5’ y 3’ que a veces pueden funcionar como secuencias potenciadoras, regiones promotoras y/o secuencias terminadoras que pueden facilitar o mejorar la transcripción eficaz del o los ácidos nucleicos de interés portados en el vector de expresión. Un vector de expresión también puede modificarse para funcionalidad de replicación y/o expresión (p. ej., transcripción y traducción) en un tipo celular,

ubicación celular o tipo de tejido particular. Los vectores de expresión pueden incluir un marcador seleccionable para el mantenimiento del vector en la célula hospedadora o receptora.

Los ejemplos de vectores son plásmidos, secuencias de replicación autónoma y elementos transponibles. Los vectores de ejemplo adicionales incluyen, de manera no taxativa, plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales de levadura (YAC, por sus siglas en inglés), cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés) o cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC, por sus siglas en inglés), bacteriófagos tales como fagos lambda o fagos M13 y virus animales. Los ejemplos de categorías de virus animales útiles como vectores incluyen, de manera no taxativa, retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (p. ej., virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (p. ej., SV40). Los ejemplos de vectores de expresión son los vectores Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo) (Clontrch), vectores pClneo (Promega) para la expresión en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST.™, pLenti6/V5-DEST.™ y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión de genes mediada por lentivirus en células de mamíferos. Las secuencias de codificación de los CAR descritos en la presente se pueden ligar en dichos vectores de expresión para la expresión de la proteína quimérica en células de mamíferos.

En determinadas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican la CAR de la presente descripción se proporcionan en un vector viral. Un vector viral puede ser aquel derivado de retrovirus, lentivirus o espumavirus. Tal como se usa en la presente, la expresión «vector viral» se refiere a una construcción de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen viral y tiene la capacidad de empaquetarse en una partícula de vector viral. El vector viral puede contener la secuencia de codificación para las diversas proteínas quiméricas descritas en la presente en lugar de genes virales no esenciales. El vector y/o la partícula puede utilizarse con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos a las células tanto *in vitro* como *in vivo.* Se conocen numerosas formas de vectores virales en la técnica.

En determinadas modalidades, el vector viral que contiene la secuencia de codificación para un CAR descrito en la presente es un vector retroviral o un vector lentiviral. La expresión «vector retroviral» hace referencia a un vector que contiene elementos genéticos funcionales y estructurales que derivan principalmente de un retrovirus. El término «vector lentiviral» hace referencia a un vector que contiene elementos funcionales y estructurales fuera de las LTR que derivan principalmente de un lentivirus.

Los vectores retrovirales para su uso en la presente pueden derivarse de cualquier retrovirus conocido (p. ej., retrovirus de tipo c, tales como virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV, por

sus siglas en inglés), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV, por sus siglas en inglés), virus del tumor mamario murino (MuMTV, por sus siglas en inglés), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV, por sus siglas en inglés), virus de la leucemia felina (VLFe), espumavirus, Friend, virus de células madre murinas (MSCV, por sus siglas en inglés) y virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés). Los retrovirus de la descripción también incluyen virus de la leucemia de linfocitos T humanos, HTLV-1 y HTLV-2, y la familia lentiviral de retrovirus, tal como virus de inmunodeficiencia humana, HIV-1, HIV-2, virus de inmunodeficiencia en simios (VIS), virus de inmunodeficiencia felina (VIF), virus de inmunodeficiencia equina (VIE) y otras clases de retrovirus.

Un vector lentiviral para su uso en la presente se refiere a un vector derivado de un lentivirus, un grupo (o género) de retrovirus que generan una enfermedad de desarrollo lento. Los virus que se incluyen dentro de este grupo incluyen VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; lo que incluye VIH tipo 1 y VIH tipo 2); Maedi-visna; el virus de la artritis-encefalitis caprina; virus de la anemia infecciosa equina; virus de la inmunodeficiencia felina (VIF); virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB); y virus de inmunodeficiencia en simios (VIS). La preparación del lentivirus recombinante puede lograrse usando los métodos de acuerdo con Dull *et ál.* y Zufferey *et ál.* (Dull *et ál., J. Virol*., 1998; 72: 8463-8471 y Zufferey *et ál., J. Virol.* 1998; 72:9873-9880).

Los vectores retrovirales (es decir, tanto lentivirales como no lentivirales) para su uso en la presente descripción pueden formarse usando técnicas de clonación convencionales al combinar las secuencias de ADN deseadas en el orden y orientación descritos en la presente (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. *et ál.* (eds.) Greene Publishing Associates (1989), secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio convencionales; Eglitis, *et ál.* (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson *et ál.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano *et ál.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber *et ál.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry *et ál.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury *et ál.* (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem *et ál.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay *et ál.* (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai *et ál*. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu *et ál.* (1993) *J. Immunol* 150:4104-4115; la patente estadounidense n.º 4,868,116; la patente estadounidense n.º 4,980,286, la solicitud PCT WO 89/07136, la solicitud PCT WO 89/02468, la solicitud PCT WO 89/05345 y la solicitud PCT WO 92/07573).

Las fuentes adecuadas para obtener secuencias retrovirales (es decir, tanto lentiviral como no lentiviral) para su uso en la formación de vectores incluyen, por ejemplo, ARN genómico y ADNc disponibles de fuentes disponibles comercialmente, lo que incluye la Type Culture Collection

(ATCC), Rockville, Md. Las secuencias también se pueden sintetizar químicamente.

Para la expresión de un CAR de HLA-A2:NY-ESO-1, el vector puede introducirse en una célula hospedadora para permitir la expresión del polipéptido dentro de la célula hospedadora. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de elementos para controlar la expresión, lo que incluye, de manera no taxativa, secuencias del promotor, secuencias de inicio de transcripción, secuencias potenciadoras, marcadores seleccionables y secuencias de señal. Estos elementos se pueden seleccionar como adecuados por un experto en la técnica, como se describió anteriormente. Por ejemplo, las secuencias del promotor pueden seleccionarse para promover la transcripción del polinucleótido en el vector. Las secuencias de promotor adecuadas incluyen, de modo no taxativo, promotor T7, promotor T3, promotor SP6, promotor de beta-actina, promotor de EF1a, promotor de CMV y promotor SV40. Se pueden seleccionar secuencias potenciadoras para potenciar la transcripción del polinucleótido. Se pueden seleccionar marcadores seleccionables para permitir la selección de células hospedadoras insertadas con el vector de las que no están insertadas, por ejemplo, los marcadores seleccionables pueden ser genes que confieren resistencia a antibióticos. Las secuencias de señal pueden seleccionarse para permitir que el polipéptido expresado se transporte fuera de la célula hospedadora.

Para la clonación del polinucleótido, el vector puede introducirse en una célula hospedadora (una célula hospedadora aislada) para permitir la replicación del vector mismo y así amplificar las copias del polinucleótido contenido en este. Los vectores de clonación pueden contener componentes de secuencia que generalmente incluyen, de manera no taxativa, un origen de replicación, secuencias del promotor, secuencias de inicio de la transcripción, secuencias potenciadoras y marcadores seleccionables. Estos elementos se pueden seleccionar como adecuados por un experto en la técnica. Por ejemplo, el origen de replicación puede seleccionarse para promover la replicación autónoma del vector en la célula hospedadora.

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona células hospedadoras aisladas que contienen los vectores proporcionados en la presente. Las células hospedadoras que contienen el vector pueden ser útiles para la expresión o clonación del polinucleótido contenido en el vector. Las células hospedadoras adecuadas pueden incluir, de manera no taxativa, células procariotas, células fúngicas, células de levadura o células eucariotas superiores, tales como células de mamífero. Las células procariotas adecuadas para este fin incluyen, de manera no taxativa, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, p. ej., *E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium, Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis, Pseudomonas* tales como *P.*

aeruginosa y *Streptomyces*.

Los CAR de la presente descripción se introducen en una célula hospedadora usando técnicas de transfección y/o transducción conocidas en la técnica. Tal como se usan en la presente, los términos «transfección» y «transducción» se refieren a los procesos mediante los cuales una secuencia de ácido nucleico exógena se introduce en una célula hospedadora. El ácido nucleico puede integrarse en el ADN de la célula hospedadora o puede mantenerse fuera del cromosoma. El ácido nucleico puede mantenerse de forma transitoria o puede ser una introducción estable. La transfección se puede lograr mediante varios medios conocidos en la técnica que incluyen, de manera no taxativa, la precipitación conjunta de ADN y fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transfección mediada por polibreno, la electroporación, la microinyección, la fusión de liposomas, la lipofección, la fusión de protoplastos, la infección retroviral y la biolística. Transducción hace referencia a la administración de uno o más genes usando un vector viral o retroviral mediante infección viral en lugar de transfección. En determinadas modalidades, los vectores retrovirales se transducen al empaquetar los vectores en viriones antes de su contacto con una célula. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR anti-HLA-A2:NY-ESO-1 portado por un vector retroviral puede transducirse en una célula a través de la infección y la integración pro virus.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «alterada genéticamente» o «modificada genéticamente» hace referencia a la adición de material genético adicional en forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Las expresiones «células genéticamente modificadas», «células modificadas» y «células redirigidas» se utilizan de forma indistinta.

En particular, un CAR de la presente descripción se introduce y expresa en las células efectoras inmunes para redirigir su especificidad a un antígeno diana de interés, p. ej., un epítopo conformacional de un péptido de NY-ESO-1 presente en HLA-A2, p. ej., los residuos de aminoácido 157-165.

La presente descripción proporciona métodos para preparar las células efectoras inmunes que expresan el CAR como se describe en la presente. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células efectoras inmunes aisladas de un sujeto, tal como un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado con el NY-ESO-1, de manera que las células efectoras inmunes expresen uno o más CAR como se describe en la presente. En determinadas modalidades, las células efectoras inmunes se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional *in vitro*. Entonces, tales células pueden volver a administrarse directamente en el mismo individuo (como para terapia autóloga) o en un individuo diferente (como para terapia alogénica). En modalidades adicionales, las células efectoras

inmunes primero se activan y estimulan para proliferarse *in vitro* antes de modificarse genéticamente para expresar un CAR. En este contexto, las células efectoras inmunes pueden cultivarse antes o después de ser modificadas genéticamente (es decir, transducidas o transfectadas para expresar un CAR como se describe en la presente).

Antes de la manipulación *in vitro* o la modificación genética de las células efectoras inmunes descritas en la presente, la fuente de las células puede obtenerse de un sujeto. En particular, las células efectoras inmunes para su uso con los CAR como se describe en la presente comprende linfocitos T. Tales linfocitos T recombinantes se denominan «cuerpos T» en la presente.

En una modalidad de la presente descripción, un cuerpo T incluye un CAR de la descripción que comprende un dominio de unión específico de la diana extracelular, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular (tal como un dominio de señalización derivado de CD3zeta o FcRgamma) y/o uno o más dominios de señalización coestimuladora derivados de una molécula coestimuladora, tal como, de manera no taxativa, CD28, CD137, CD134 o CD278. En otra modalidad de la presente descripción, un cuerpo T incluye un CAR de la descripción que comprende un dominio de unión específico de la diana extracelular, un dominio transmembrana, una región bisagra o espaciador entre el dominio de unión extracelular y el dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular (tal como un dominio de señalización derivado de CD3zeta o FcRgamma) y/o uno o más dominios de señalización coestimuladora derivados de una molécula coestimuladora. En aún otra modalidad de la presente descripción, un cuerpo T incluye un CAR de construcción de cuerpo T que comprende un dominio de unión específico de la diana extracelular y un dominio constante del receptor de linfocitos T. El dominio de unión específico de la diana extracelular adecuado para su uso en un cuerpo T que comprende cualquiera de los CAR descritos en la presente puede comprender un Fab, un Fab', un (Fab')2, un Fv, o un Fv de cadena simple (scFv) de una proteína de unión al antígeno de la descripción.

Se pueden obtener linfocitos T de diversas fuentes que incluyen, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas modalidades, el linfocito T se puede obtener de una unidad de sangre del sujeto recogida mediante diversas técnicas conocidas por el experto en la técnica, tal como la separación de FICOLL. En una modalidad, se obtienen células de la sangre en circulación de un individuo mediante aféresis. El producto de la aféresis típicamente contiene linfocitos, lo que incluye linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros leucocitos nucleados, eritrocitos y plaquetas. En una modalidad, las células extraídas mediante aféresis se pueden lavar para retirar la fracción de plasma y colocar las células en un amortiguador o medio adecuado para el procesamiento posterior. En una modalidad

de la descripción, las células se lavan con PBS. En una modalidad alternativa, la solución lavada carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos cationes divalentes, si no todos. Como observarán los expertos en la técnica, una etapa de lavado puede lograrse por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como al usar una centrífuga de flujo continuo semiautomática. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de amortiguadores biocompatibles u otra solución salina con o sin amortiguador. En determinadas modalidades, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden retirarse en medio de cultivo resuspendido directamente en la célula.

En determinadas modalidades, los linfocitos T se aíslan de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), al lisar los eritrocitos y agotar los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Una subpoblación específica de linfocitos T, tales como los linfocitos T CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+ puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de linfocitos T mediante selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método para usar en la presente es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. También se pueden utilizar citometría de flujo y clasificación celular para aislar poblaciones celulares de interés para uso en la presente descripción.

Las PBMC se pueden usar directamente para la modificación genética con los CAR usando los métodos como los que se describen en la presente. En determinadas modalidades, después del aislamiento de PBMC, los linfocitos T se aíslan adicionalmente y en ciertas modalidades, tanto los linfocitos T citotóxicos como los colaboradores se pueden clasificar en subpoblaciones de linfocitos T sin tratamiento, de memoria y efectores antes o después de la modificación y/o expansión genética. Las células CD8+ se pueden obtener utilizando métodos convencionales. En algunas modalidades, las células CD8+ se clasifican adicionalmente en células sin tratamiento, de memoria centrales y efectoras, identificando antígenos de la superficie celular asociados con cada uno de dichos tipos de células CD8+. En modalidades, los linfocitos T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de los linfocitos de sangre periférica CD8+. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8+ y CD62L+CD8+ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas modalidades, la expresión de marcadores fenotípicos de TCM de

memoria central incluyen CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativos para la granzima B. En algunas modalidades, los linfocitos T de memoria central son linfocitos T CD45RO+, CD62L+, CD8+. En algunas modalidades, los linfocitos T efectores son negativos para CD62L, CCR7, CD28 y CD127 y positivos para granzima B y perforina. En algunas modalidades, los linfocitos T CD8 + sin tratamiento se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de linfocitos T sin tratamiento que incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA.

En determinadas modalidades, los linfocitos T CD4+ se clasifican adicionalmente en subpoblaciones. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ auxiliares pueden clasificarse en células sin tratamiento, de memoria centrales y efectoras al identificar poblaciones celulares con antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4+ se pueden obtener utilizando métodos convencionales. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4 + sin tratamiento son linfocitos T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+. En algunas modalidades, las células CD4+ de memoria centrales son positivas para CD62L y CD45RO. En algunas modalidades, las células CD4+ efectoras son negativas para CD62L y CD45RO.

Las células efectoras inmunes, tales como los linfocitos T, se pueden modificar genéticamente luego de aislamiento con métodos estándares o las células efectoras inmunes se pueden activar y expandir (o diferenciarse en el caso de progenitores) *in vitro* antes de modificarse genéticamente. En otra modalidad, las células efectoras inmunes, tales como los linfocitos T, se modifican genéticamente con los receptores de antígeno quimérico descritos en la presente (p. ej., se transducen con un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR) y luego se activan y expanden *in vitro*. Los métodos para activar y expandir los linfocitos T se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,905,874; la patente estadounidense n.º 6,867,041; la patente estadounidense n.º 6,797,514; WO2012079000, US 2016/0175358. En general, dichos métodos incluyen poner en contacto las PBMC o los linfocitos T aislados con un agente estimulante y un agente coestimulador, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas adecuadas, como IL-2. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma perla sirven como una célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) «sustituta». En otras modalidades, los linfocitos T se pueden activar y estimular para proliferarse con células de alimentación y anticuerpos y citocinas adecuados, utilizando métodos como los descritos en la patente estadounidense n.º 6,040,177; la patente estadounidense n.° 5,827,642 y WO2012129514.

La descripción proporciona una población de células efectoras inmunes modificadas para el tratamiento de un trastorno o enfermedad asociado con NY-ESO-1, p. ej., cáncer, las células efectoras inmunes modificadas comprenden un CAR de HLA-A2:NY-ESO-1 como se describe en

la presente.

Las células efectoras inmunes que expresan CAR preparadas como se describe en la presente se pueden utilizar en métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva de acuerdo con técnicas conocidas o variaciones de estas que serán evidentes para los expertos en la técnica en función de la presente descripción. Ver, p. ej., la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0170238 de Gruenberg *et ál*; ver también la patente estadounidense n.º 4,690,915 de Rosenberg.

En algunas modalidades, las células se formulan al primero cosecharlas de su medio de cultivo y luego lavando y concentrando las células en un medio y sistema de contenedor adecuado para su administración (un portador «farmacéuticamente aceptable») en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, generalmente pueden utilizarse solución salina normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también dextrosa al 5 % en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede suplementar con albúmina de suero humano.

Una cantidad eficaz para el tratamiento de células en la composición es al menos 2 células (por ejemplo, al menos 1 linfocitos T de memoria central CD8+ y al menos 1 subconjunto de linfocito T auxiliar CD4+) o es más típicamente mayor que 10^2 células y hasta 10^6, hasta 10^8 o 10^9 células inclusive y puede ser más de 10^{10} células. La cantidad de células dependerá del uso final para el cual se pretenda la composición, así como el tipo de células que allí se incluyan.

Las células pueden ser autólogas o heterólogas para el paciente que se someta a la terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (p. ej., PHA) o linfoquinas, citocinas y/o quimiocinas (p. ej., IFN-γ, IL-2, IL-12, TNF-α IL-18 y TNF-β, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1α, etc.), como se describe en la presente para potenciar la inducción de la respuesta inmunitaria.

Las poblaciones de células efectoras inmunes que expresan CAR de la presente descripción pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender una población de células efectoras inmunes que expresa CAR, tal como linfocitos T, como se describe en la presente, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender amortiguadores tal como solución salina amortiguada neutral, solución salina amortiguada con fosfato y similares; carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos como glicina; antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutationa; adyuvantes

(por ejemplo, hidróxido de aluminio) y conservantes. Las composiciones de la presente descripción se formulan preferentemente para administración intravenosa.

La respuesta inmune anti-tumoral inducida en un sujeto al administrar linfocitos T que expresan CAR descritos en la presente usando los métodos descritos en la presente, u otros métodos conocidos en la técnica, pueden incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por linfocitos T citotóxicos capaces de eliminar células infectadas, linfocitos T reguladores y respuestas de linfocitos T auxiliares. También se pueden inducir respuestas inmunitarias humorales, mediadas principalmente por linfocitos T auxiliares con la capacidad de activar linfocitos B y así llevar a producción de anticuerpos. Se pueden utilizar diversas técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente descripción, que se describen correctamente en la técnica, p. ej., *Current Protocols in Immunology*, editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona métodos para tratar un individuo diagnosticado con, o que se sospecha sufre, o tiene riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno asociado a NY-ESO-1, p. ej., cáncer positivo para NY-ESO-1, que comprende administrarle al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de las células efectoras inmunes que expresan CAR como se describe en la presente.

En una modalidad, la descripción proporciona un método para tratar a un sujeto diagnosticado con un cáncer positivo para NY-ESO-1 que comprende eliminar las células efectoras inmunes de un sujeto diagnosticado con un cáncer positivo para NY-ESO-1, modificando genéticamente dichas células efectoras inmunes con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico de la presente descripción, produciendo así una población de células efectoras inmunes modificadas y administrando la población de células efectoras inmunes modificadas al mismo sujeto. En una modalidad, las células efectoras inmunes comprenden linfocitos T.

Los métodos para administrar las composiciones celulares descritas en la presente incluyen cualquier método que sea eficaz para dar como resultado la reintroducción de células efectoras inmunes modificadas genéticamente *ex vivo* que expresan directamente un CAR de la descripción en el sujeto o la reintroducción de los progenitores modificados genéticamente de las células efectoras inmunes, que al ser introducidas en un sujeto, se diferencian en células efectoras inmunes maduras que expresan el CAR. Un método comprende la transducción de células T de sangre periférica *ex vivo* con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la descripción y el retorno de las células transducidas al sujeto.

Administración terapéutica y formulaciones

La descripción proporciona composiciones terapéuticas que comprenden las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos o CAR de la presente descripción. Las composiciones terapéuticas conforme a la descripción se administrarán con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para proporcionar mejoras en la transferencia, administración, tolerancia y similares. Pueden encontrarse múltiples formulaciones apropiadas en el recetario conocido por todo químico farmacéutico: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicas o aniónicas) (como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Ver también Powell *et ál.* «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

La dosis de la proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno de este, puede variar según la edad y tamaño del sujeto al que se le administran, la enfermedad diana, las afecciones, la vía de administración y similares. Cuando una proteína de unión al antígeno de la presente descripción se usa para tratar una enfermedad o un trastorno en un paciente adulto o para prevenir tal enfermedad, es conveniente administrar la proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno de este, de la presente descripción normalmente en una dosis única de alrededor de 0.1 a alrededor de 60 mg/kg de peso corporal, más preferentemente alrededor de 5 a alrededor de 60, de alrededor de 20 a alrededor de 50, de alrededor de 10 a alrededor de 50, de alrededor de 1 a alrededor de 10 o de alrededor de 0.8 a alrededor de 11 mg/kg de peso corporal. Se pueden adaptar la frecuencia y la duración del tratamiento, dependiendo de la gravedad de la afección. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno de este, de la descripción se pueden administrar con una dosis inicial de al menos alrededor de 0.1 mg a alrededor de 800 mg, de alrededor de 1 a alrededor de 500 mg, de alrededor de 5 a alrededor de 300 mg o de alrededor de 10 a alrededor de 200 mg, a alrededor de 100 mg o a alrededor de 50 mg. En determinadas modalidades, la dosis inicial puede estar seguida por la administración de una segunda dosis o múltiples dosis posteriores de la proteína de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno de este, en una cantidad que puede ser aproximadamente la misma o menor que la dosis inicial, en donde las dosis posteriores se separan

por al menos 1 día a 3 días; al menos una semana, al menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9 semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

Se conocen diversos sistemas de administración que se pueden utilizar para administrar la composición farmacéutica de la descripción, p. ej., la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (ver, p. ej., Wu *et ál.* (1987) *J. Biol. Chem*. 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, de modo no taxativo, las vías intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La composición farmacéutica también puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver, por ejemplo, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

El uso de nanopartículas para administrar las proteínas de unión al antígeno, p. ej., anticuerpo, o fragmentos de unión al antígeno de este, de la presente descripción también se contempla en la presente. Las nanopartículas conjugadas a la proteína de unión al antígeno pueden usarse para aplicaciones tanto terapéuticas como diagnósticas. Las nanopartículas conjugadas a la proteína de unión al antígeno y los métodos de su preparación y uso se describen en detalle por Arruebo, M., et ál. 2009 («Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications» en *J. Nanomat*. volumen 2009, artículo ID 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), incorporado a la presente mediante referencia. Las nanopartículas pueden desarrollarse y conjugarse con proteínas de unión al antígeno contenidas en composiciones farmacéuticas para dirigirse a células tumorales o células de tejido autoinmune o células infectadas con virus. Las nanopartículas para la administración de fármacos también han sido descritas en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8,257,740 o la patente estadounidense n.º 8,246,995, cada una incorporada en la presente en su totalidad.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede utilizar una bomba. En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos. En aun otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana de la composición, lo que requiere solo una fracción de la dosis sistémica.

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas, intracraneales, intraperitoneales e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos ampliamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar, p. ej., mediante la disolución, suspensión o emulsión de la proteína de unión al antígeno o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso que se utilice convencionalmente en inyecciones. Pueden ser medios acuosos para inyecciones, por ejemplo, una solución salina fisiológica, una solución isotónica con glucosa y otros agentes auxiliares, etc., los cuales se pueden utilizar en combinación con un agente solubilizante apropiado, como un alcohol (p. ej., etanol), un polialcohol (p. ej., propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico (p. ej., polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado), etc. Puede utilizarse como medio de aceite, p. ej., aceite de sésamo, aceite de soja, etc., los cuales se pueden utilizar en combinación con un agente solubilizante como benzoato de bencilo, alcohol de bencilo, etc. Preferentemente, la inyección así preparada se llena en una ampolla apropiada.

Una composición farmacéutica de la presente descripción se puede suministrar por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa estándar. Además, respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración tipo lapicera (pen) puede aplicarse a la administración de una composición farmacéutica de la presente descripción. Dicho dispositivo de administración tipo lapicera puede reutilizarse o ser descartable. En general, un dispositivo de administración tipo lapicera usa cartuchos reemplazables que contienen una composición farmacéutica. Una vez que toda la composición farmacéutica del cartucho se administró y que el cartucho está vacío, este puede descartarse fácilmente y reponerse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. Luego puede reutilizarse el dispositivo de administración tipo lapicera. En un dispositivo de administración tipo lapicera descartable no hay cartuchos reemplazables. En cambio, el dispositivo de administración tipo lapicera descartable se proporciona ya lleno con la composición farmacéutica en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que la composición farmacéutica se vacía del depósito, se descarta todo el dispositivo.

Se pueden emplear diferentes dispositivos de suministro tipo lapicera y de auto inyección reutilizables para el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente descripción. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), el dispositivo DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suiza), el dispositivo HUMALOG MIX 75/25™, el dispositivo HUMALOG™, el dispositivo HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague Dinamarca), el dispositivo BD™

(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania), entre otros. Los ejemplos de dispositivos de administración descartables tipo lapicera aplicables para la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, el dispositivo SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.) y el dispositivo HUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park, IL), entre otros.

De forma conveniente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad de la proteína de unión al antígeno contenida suele ser de entre alrededor de 5 y alrededor de 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; se prefiere, especialmente en forma de inyección, que la proteína de unión al antígeno mencionado anteriormente esté contenido entre alrededor de 5 y alrededor de 100 mg y entre alrededor de 10 y alrededor de 250 mg para las otras formas de dosificación.

Usos terapéuticos de las proteínas de unión al antígeno

Los anticuerpos de la descripción son útiles, entre otros, para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con NY-ESO-1 o mediado por este. Por ejemplo, la presente descripción proporciona métodos para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con NY-ESO-1, tal como un cáncer asociado con NY-ESO-1 (p. ej., un cáncer positivo para NY-ESO-1) (inhibición del crecimiento tumoral) al administrar una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 (o una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1) como se describe en la presente a un paciente que necesita tal tratamiento y proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 (o una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1) para uso en el tratamiento de un cáncer asociado con NY-ESO-1 (inhibición del crecimiento tumoral). Las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción son útiles para tratar, prevenir y/o mejorar una enfermedad o trastorno o afección tal como un cáncer asociado con NY-ESO-1 y/o para mejorar al menos un síntoma asociado con tal enfermedad, trastorno o afección. En el contexto de los métodos de tratamiento descritos en la presente, la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 se puede administrar como monoterapia (es decir, como el único agente terapéutico) o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales (cuyos ejemplos se describen

en otra parte de la presente).

En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente son útiles para tratar sujetos que padecen cáncer primario o recurrente, lo que incluye, de manera no taxativa, cáncer asociado con NY-ESO-1, p. ej., un liposarcoma, un neuroblastoma, un mieloma, un melanoma metastásico, un sarcoma sinovial, un cáncer de vejiga, un cáncer del esófago, un cáncer hepatocelular, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, tumor astrocítico, glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, tumor cerebral, cáncer de trompas de Falopio, cáncer epitelial de ovario, cáncer de cavidad peritoneal primario, tumores sólidos avanzados, sarcoma de tejido blando, melanoma, un sarcoma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma sinovial, tumores sólidos metastásicos, cáncer de esófago, rabdomiosarcoma, mixoide avanzado, liposarcoma de célula redonda, melanoma metastásico o cáncer de pulmón no microcítico recurrente.

Las proteínas de unión al antígeno pueden usarse para tratar síntomas de etapa temprana o etapa avanzada del cáncer asociado con NY-ESO-1. En una modalidad, un anticuerpo o fragmento de este de la descripción se puede usar para tratar cáncer avanzado o metastásico. Las proteínas de unión al antígeno son útiles para reducir o inhibir o encoger el crecimiento tumoral. En determinadas modalidades, el tratamiento con una proteína de unión al antígeno de la descripción conduce a más de 40 % de regresión, más de 50 % de regresión, más de 60 % de regresión, más de 70 % de regresión, más de 80 % de regresión o más de 90 % de regresión de un tumor en un sujeto. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno se pueden usar para prevenir la reincidencia de un tumor. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno son útiles para extender la supervivencia libre de evolución o la supervivencia general en un sujeto con un cáncer asociado con NY-ESO-1. En algunas modalidades, los anticuerpos son útiles para reducir la toxicidad debido a quimioterapia o radioterapia mientras se mantiene la supervivencia a largo plazo en un paciente que sufre de cáncer asociado con NY-ESO-1.

Uno o más anticuerpos de la presente descripción pueden administrarse para aliviar o evitar o disminuir la gravedad de uno o más de los síntomas o afecciones de la enfermedad o trastorno.

También se contempla en la presente usar uno o más anticuerpos de la presente descripción de manera profiláctica en pacientes con riesgo de padecer una enfermedad o un trastorno tal como una enfermedad o un trastorno asociado con NY-ESO-1, tal como un cáncer asociado con NY-ESO-1.

En una modalidad adicional de la descripción, los anticuerpos actuales se utilizan para preparar una composición farmacéutica para tratar pacientes que padecen una enfermedad o un trastorno

asociado con NY-ESO-1, tal como un cáncer asociado con NY-ESO-1. En otra modalidad de la descripción, los anticuerpos actuales se usan como terapia complementaria con cualquier otro agente o cualquier otra terapia conocida por los expertos en la técnica útil para tratar cáncer asociado con NY-ESO-1.

Formulaciones y terapias de combinación

Las terapias de combinación pueden incluir una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción, tal como un CAR de la descripción (p. ej., una célula efectora inmune que comprende un CAR de la descripción) o una composición farmacéutica de la descripción y cualquier agente terapéutico adicional que pueda combinarse de manera favorable junto con una proteína de unión al antígeno de la descripción. Las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción pueden combinarse de manera sinérgica con uno o más fármacos o terapia contra el cáncer usados para tratar o inhibir una enfermedad o un trastorno asociado con NY-ESO-1, tal como un cáncer positivo para NY-ESO-1, p. ej., un liposarcoma, un neuroblastoma, un mieloma, un melanoma metastásico, un sarcoma sinovial, un cáncer de vejiga, un cáncer del esófago, un cáncer hepatocelular, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, tumor astrocítico, glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, tumor cerebral, cáncer de trompas de Falopio, cáncer epitelial de ovario, cáncer de cavidad peritoneal primario, tumores sólidos avanzados, sarcoma de tejido blando, melanoma, un sarcoma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma sinovial, tumores sólidos metastásicos, cáncer de esófago, rabdomiosarcoma, mixoide avanzado, liposarcoma de célula redonda, melanoma metastásico o cáncer de pulmón no microcítico recurrente.

Se contempla en la presente el uso de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción junto con terapias inmunoestimuladoras y/o de apoyo inmune para inhibir el crecimiento tumoral y/o mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer. Las terapias inmunoestimuladoras incluyen terapias inmunoestimuladoras directas para aumentar la actividad de las células inmunes al «soltar el freno» en células inmunes suprimidas o «pisar el acelerador» para activar una respuesta inmune. Los ejemplos incluyen dirigirse a otros receptores de punto de control, vacunación y adyuvantes. Las modalidades de apoyo inmune pueden aumentar la antigenicidad del tumor al promover la eliminación de células inmunogénicas, inflamación o tener otros efectos indirectos que promueven una respuesta inmunitaria anti-tumoral. Los ejemplos incluyen radiación, quimioterapia, agentes anti-angiogénicos y cirugía.

En diversas modalidades, una o más proteínas de unión al antígeno de la presente descripción

pueden usarse junto con inhibidor de PD-1 (p. ej., un anticuerpo anti-PD-1 tal como nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab, BGB-A317 o REGN2810), un inhibidor de PD-L1 (p. ej., un anticuerpo anti-PD-L1 tal como avelumab, atezolizumab, durvalumab, MDX-1105 o REGN3504), un inhibidor de CTLA-4 (p. ej., ipilimumab), un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un inhibidor de GITR, un antagonista de otro ligando o co-inhibidor de linfocitos T (p. ej., un anticuerpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 o VISTA), un inhibidor de indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) (p. ej., un «VEGF-Trap» tal como aflibercept u otra proteína de fusión que inhibe VEGF como se establece en US 7,087,411 o un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión al antígeno de este (p. ej., bevacizumab o ranibizumab) o un inhibidor de cinasa de molécula pequeña del receptor del VEGF (p. ej., sunitinib, sorafenib o pazopanib)), un inhibidor de Ang2 (p. ej., nesvacumab), un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ, por sus siglas en inglés), un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) (p. ej., erlotinib, cetuximab), un inhibidor CD20 (p. ej., un anticuerpo anti-CD20 tal como rituximab), un anticuerpo para un antígeno específico para el tumor (p. ej., CA9, CA125, antígeno 3 asociado al melanoma (MAGE3, por sus siglas en inglés), antígeno carcinoembrionico (CEA, por sus siglas en inglés), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico para la próstata (PSA, por sus siglas en inglés), mucina-1, MART-1 y CA19-9), una vacuna (p. ej., bacilo de Calmette-Guerin, una vacuna contra el cáncer), un adyuvante para aumentar la presentación de antígenos (p. ej., factor de estímulo de colonias de macrófagos y granulocitos), un anticuerpo biespecífico (p. ej., anticuerpo biespecífico CD3xCD20 o anticuerpo biespecífico PSMAxCD3), una citotoxina, un agente quimioterapéutico (p. ej., dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorrubicina, daunorrubicina, cisplatino, carboplatino, gemcitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel y vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, cirugía, un inhibidor de IL-6R (p. ej., sarilumab), un inhibidor IL-4R (p. ej., dupilumab), un inhibidor de IL-10, una citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21 y IL-15, un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) (p. ej., ADC anti-CD19-DM4 y ADC anti-DS6-DM4), un fármaco anti-inflamatorio (p. ej., corticosteroides y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos), un complemento alimenticio tal como anti-oxidantes o cualquier otro cuidado terapéutico para tratar cáncer. En determinadas modalidades, la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción puede usarse junto con vacunas contra el cáncer, lo que incluye vacunas de células dendríticas, virus oncolíticos, vacunas de células tumorales, etc. para aumentar la respuesta anti-tumoral. Los ejemplos de vacunas contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción incluyen la

vacuna de MAGE3 para melanoma y cáncer de vejiga, la vacuna de MUC1 para el cáncer de mama, EGFRv3 (p. ej., Rindopepimut) para el cáncer de cerebro, (lo que incluye glioblastoma multiforme) o ALVAC-CEA (para cánceres CEA+).

En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción pueden administrarse junto con terapia de radiación en métodos para generar respuestas anti-tumorales duraderas a largo plazo y/o mejorar la supervivencia de pacientes con cáncer. En algunas modalidades, las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción pueden administrarse antes, al mismo tiempo o después de administrar terapia de radiación a un paciente con cáncer. Por ejemplo, la terapia de radiación puede administrarse en una o más dosis a lesiones tumorales seguido por la administración de una o más dosis de proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción. En algunas modalidades, la terapia de radiación puede administrarse de manera local a una lesión tumoral para mejorar la inmunogenicidad local del tumor de un paciente (radiación de adyuvación) y/o para eliminar células tumorales (radiación ablativa) seguido por la administración sistémica de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción. Por ejemplo, la radiación intracraneal puede administrarse a un paciente con cáncer cerebral (p. ej., gliobastoma multiforme) junto con administración sistémica de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción. En determinadas modalidades, las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción se pueden administrar junto con terapia de radiación y un agente quimioterapéutico (p. ej., temozolomida) o un antagonista del VEGF (p. ej., aflibercept).

El o los componentes/agentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar antes, al mismo tiempo o luego de la administración de las proteínas de unión al anticuerpo anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción. Para fines de la presente descripción, tales regímenes de administración se consideran la administración de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 «en combinación con» un segundo componente terapéuticamente activo.

El o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto antes de la administración de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción. Por ejemplo, un primer componente se puede considerar como administrado «antes de» un segundo componente si el primer componente se administra 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, 5 minutos antes o menos de 1 minuto antes de la administración del segundo componente. En otras modalidades, el o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto después de la

administración de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción. Por ejemplo, un primer componente se puede considerar como administrado «después de» un segundo componente si el primer componente se administra 1 minuto después, 5 minutos después, 10 minutos después, 15 minutos después, 30 minutos después, 1 hora después, 2 horas después, 3 horas después, 4 horas después, 5 horas después, 6 horas después, 12 horas después, 24 horas después, 36 horas después, 48 horas después, 60 horas después, 72 horas después o 1 semana después de la administración del segundo componente. En aun otras modalidades, el o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto al mismo tiempo que la administración de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción. La administración «al mismo tiempo», a los efectos de la presente descripción incluye, p. ej., la administración de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 y un componente terapéuticamente activo adicional a un sujeto en una forma de dosificación unitaria (p. ej., co-formulados) o en formas de dosificación separadas administradas al sujeto con alrededor de 30 minutos o menos de separación entre sí. Si se administra en formas de dosificación separadas, cada forma de dosificación se puede administrar a través de la misma vía (p. ej., tanto la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 como el componente terapéuticamente activo adicional se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, etc.); de manera alternativa, cada forma de dosificación se puede administrar a través de una vía diferente (p. ej., la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 se puede administrar por vía intravenosa y el componente terapéuticamente activo adicional se puede administrar por vía subcutánea). En todo caso, se considera que la administración de los componentes en una forma de dosificación unitaria, en formas de dosificación separadas por la misma vía o en formas de dosificación separadas por vías diferentes son todas «administración al mismo tiempo» a los efectos de la presente descripción. A los efectos de la presente descripción, se considera que la administración de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 «antes de», «al mismo tiempo que» o «después de» (tal como se definen estas expresiones anteriormente en la presente) la administración de un componente terapéuticamente activo adicional es la administración de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 «en combinación con» un componente terapéuticamente activo adicional.

La presente descripción incluye composiciones farmacéuticas en las que una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción se formula de forma conjunta con uno o más del o los componentes terapéuticamente activos adicionales, tal como se describe en otra parte de la presente usando una variedad de combinaciones de dosificación.

Regímenes de administración

De acuerdo con determinadas modalidades de la presente descripción, se pueden administrar múltiples dosis de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales mencionados en la presente) a un sujeto durante un período de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la descripción comprenden administrar secuencialmente a un sujeto múltiples dosis de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción. Tal como se usa en la presente, «administrar en secuencia» significa que cada dosis de proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 se administra al sujeto en un momento distinto, p. ej., en distintos días separados por un intervalo predeterminado (p. ej., horas, días, semanas o meses). La presente descripción incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una única dosis inicial de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1, seguido por una o más dosis secundarias de la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 y, opcionalmente, seguido por una o más dosis terciarias de la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1. La proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 puede administrarse en una dosis de entre 0.1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

Las expresiones «dosis inicial», «dosis secundarias» y «dosis terciarias» hacen referencia a la secuencia temporal de administración de la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la descripción. Por lo tanto, la «dosis inicial» es la dosis que se administra al principio del régimen de tratamiento (también denominada «dosis de referencia»), las «dosis secundarias» son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las «dosis terciarias» son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis inicial, secundarias y terciarias pueden contener todas la misma cantidad de proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1, pero generalmente pueden diferir entre sí en relación con la frecuencia de administración. No obstante, en determinadas modalidades, la cantidad de proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 contenida en las dosis inicial, secundarias y/o terciarias varía de una a otra (p. ej., se aumenta o disminuye, según corresponda) durante el transcurso del tratamiento. En determinadas modalidades, se administran dos o más (p. ej., 2, 3, 4 o 5) dosis al comenzar el régimen de tratamiento como «dosis de carga», seguidas por dosis posteriores que se administran con menor frecuencia (p. ej., «dosis de mantenimiento»).

En determinadas modalidades, la cantidad de proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 contenida en las dosis inicial, secundarias y/o terciarias puede ser sub-óptima o sub-terapéutica. Tal como se utilizan en la presente, las expresiones «sub-terapéutico» o «sub-óptimo» se refieren a una dosis de anticuerpo administrada a un nivel demasiado bajo para producir un efecto

terapéutico o por debajo del nivel necesario para tratar una enfermedad tal como cáncer.

En determinadas modalidades de ejemplo de la presente descripción, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra entre 1 y 26 (p. ej., 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase «la dosis inmediatamente anterior», según se usa en la presente memoria, significa, en una secuencia de administraciones múltiples, la dosis de proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que se administra a un paciente antes de la administración de la próxima dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la descripción pueden comprender administrarle a un paciente cualquier cantidad de dosis secundarias y/o terciarias de una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1. Por ejemplo, en determinadas modalidades, se administra al paciente una única dosis secundaria. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias. De manera similar, en determinadas modalidades, se administra al paciente una única dosis terciaria. En otras modalidades, se administran al paciente dos o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias.

En modalidades que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria puede administrarse al paciente entre 1 y 2 semanas o 1 y 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. De forma similar, en modalidades que suponen múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar con la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria puede administrarse al paciente entre 2 y 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En determinadas modalidades, la frecuencia a la que se administran las dosis secundarias y/o terciarias a un paciente puede variar durante el régimen de tratamiento. Un médico puede también ajustar la frecuencia de administración durante el tratamiento según las necesidades del paciente individual, tras una evaluación clínica.

Usos diagnósticos de las proteínas de unión al antígeno

Las proteínas de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de la presente descripción se pueden usar para detectar y/o medir NY-ESO-1 en una muestra, p. ej., con fines de diagnóstico. Algunas modalidades contemplan el uso de una o más proteínas de unión al antígeno de la presente descripción en ensayos para detectar una enfermedad o un trastorno tal como una enfermedad o un trastorno asociado al NY-ESO-1, tal como un cáncer positivo para NY-ESO-1. Los ensayos de diagnóstico de ejemplo para NY-ESO-1 pueden comprender, p. ej., poner en contacto una muestra de un sujeto (p. ej., un paciente) con una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 de

la descripción, en donde la proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 se etiqueta con una molécula indicadora o etiqueta detectable o se usa como un ligando de captura para aislar de manera selectiva el NY-ESO-1 de las muestras del sujeto. De manera alternativa, puede utilizarse una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1 sin etiquetar en aplicaciones de diagnóstico junto con una proteína de unión al antígeno secundaria, p. ej., anticuerpo, que a su vez se etiqueta de forma detectable. La molécula indicadora o etiqueta detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S o ^{125}I, un resto fluorescente o quimioluminiscente, como isotiocianato de fluoresceína o rodamina, o una enzima como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ejemplos específicos de ensayos que se pueden usar para detectar o medir NY-ESO-1 en una muestra incluyen ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés).

Las muestras que pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico de NY-ESO-1 de acuerdo con la presente descripción incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que se pueda obtener de un sujeto, que contenga cantidades detectables de proteína de NY-ESO-1, o fragmentos de esta, en condiciones normales o patológicas. En general, se miden los niveles de NY-ESO-1 en una muestra particular obtenida de un paciente saludable (p. ej., un paciente que no padece una enfermedad o un trastorno asociado con NY-ESO-1, p. ej., un cáncer positivo para NY-ESO-1) para establecer inicialmente un nivel de referencia, o estándar, de NY-ESO-1. Entonces, este nivel de referencia de NY-ESO-1 puede compararse con los niveles de NY-ESO-1 medidos en muestras que se obtuvieron de individuos que se sospecha que padecen una afección relacionada con cáncer, o síntomas asociados con tal afección.

Las proteínas de unión al antígeno específicas para NY-ESO-1 pueden no contener restos o etiquetas adicionales o pueden contener un resto o etiqueta de extremo C o extremo N. En una modalidad, la etiqueta o el resto es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de una etiqueta (si la hubiere) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie a la que está unido el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina de extremo N se orientará de tal manera que la parte de extremo C del péptido se encuentre distal a la superficie.

Los aspectos de la descripción se refieren al uso de las proteínas de unión al antígeno descritas como marcadores para predecir la prognosis de cáncer positivo para NY-ESO-1 en pacientes. Las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico para evaluar la prognosis de cáncer en un paciente y para predecir la supervivencia.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo usar y elaborar los métodos y composiciones de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran es su invención. Se han llevado a cabo esfuerzos para asegurar la exactitud de las cifras usadas (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se expresa en grados centígrados, la temperatura ambiente es de alrededor de 25 ºC y la presión es presión atmosférica o una presión cercana a esta.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos para HLA-A2:NY-ESO-1_157-165

Se generaron anticuerpos humanos para HLA-A2:NY-ESO-1 usando un fragmento del péptido de NY-ESO-1 acoplado con HLA-A2 del acceso de GenBank NP_001318.1 (SEQ ID NO: 271) que incluye los aminoácidos 157-165 que tienen la cisteína (C) en la posición 165 sustituida con una valina (V) (SLLMWITQV; “NY-ESO-1_V”); SEQ ID NO: 291). El inmunógeno se administró directamente, con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria, a un ratón VELOCIMMUNE® (es decir, un ratón modificado que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana que codifica ADN), p. ej., como se describió en la patente estadounidense n.° 8,502,018. La respuesta inmunitaria del anticuerpo se monitoreó mediante un inmunoensayo específico para HLA-A2:NY-ESO-1. Cuando se logró una respuesta inmunitaria deseada, se recogieron esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se analizaron y seleccionaron para identificar las líneas celulares que producen anticuerpos específicos para HLA-A2:NY-ESO-1. Al usar esta técnica, y el inmunógeno descrito anteriormente, se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-NY-ESO-1 (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón).

Los anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 también se aislaron directamente de linfocitos B positivos para el antígeno (de cualquiera de los ratones inmunizados) sin fusión a células de mieloma, tal como se describe en la patente estadounidense 7,582,298, incorporada específicamente a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Mediante el uso de este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 completamente humanos (es decir, anticuerpos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes humanos).

Los anticuerpos de ejemplo generados de acuerdo con los métodos que preceden se designaron como figura a continuación: mAb24955N; mAb24956N; mAb24958N; mAb24959N; mAb28042P; mAb28035P; mAb28037P2; mAb28075P; mAb28105P; mAb28113P; mAb28128P; mAb29814P; mAb24955N; y mAb29822P2.

Las propiedades biológicas de los anticuerpos de ejemplo generados conforme a los métodos de este Ejemplo se describen detalladamente en los Ejemplos que siguen.

Ejemplo 2: Secuencias de nucleótidos y aminoácido de región variable de cadena pesada y ligera

La Tabla 1 indica los identificadores de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera, las CDR y las cadenas pesada y ligera de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 seleccionados de la presente descripción. Los identificadores de secuencia de ácido nucleico correspondientes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos

	SEQ ID NO:							
Designación del anticuerpo	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
mAb24955N	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb24956N	22	24	26	28	30	32	34	36
mAb24958N	42	44	46	48	50	52	54	56
mAb24959N	62	64	66	68	70	72	74	76
mAb28042P	82	84	86	88	90	92	94	96
mAb28035P	102	104	106	108	110	112	114	116
mAb28037P2	122	124	126	128	130	132	134	136
mAb28075P	142	144	146	148	150	152	154	156
mAb28105P	162	164	166	168	170	172	174	156
mAb28113P	180	144	182	184	186	188	154	190
mAb28128P	196	164	199	201	203	172	174	205
mAb29814P	211	213	215	217	219	221	174	224
mAb24955N2	230	232	234	236	238	240	242	244
mAb29822P2	250	252	254	256	258	260	262	264

Tabla 2: Identificadores de secuencias de ácido nucleico

	SEQ ID NO:

Designación del anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb24955N	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb24956N	21	23	25	27	29	31	33	35
mAb24958N	41	43	45	47	49	51	53	55
mAb24959N	61	63	65	67	69	71	73	75
mAb28042P	81	83	85	87	89	91	93	95
mAb28035P	101	103	105	107	109	111	113	115
mAb28037P2	121	123	125	127	129	131	133	135
mAb28075P	141	143	145	147	149	151	153	155
mAb28105P	161	163	165	167	169	171	173	155
mAb28113P	179	143	181	183	185	187	153	189
mAb28128P	195	197	198	200	202	171	173	204
mAb29814P	210	212	214	216	218	220	222	223
mAb24955N2	229	231	233	235	237	239	241	243
mAb29822N2	249	251	253	255	257	259	261	263

Típicamente, los anticuerpos se mencionan en la presente según la siguiente nomenclatura: Prefijo Fc (p. ej., «mAb», etc.), seguido por un identificador numérico (p. ej., «17670», «17930», etc., como se muestra en la Tabla 1), seguido por un sufijo «P», «N» o «N2». Por lo tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede denominarse en la presente, p. ej., «mAb17670P», «mAb17930N», «mAb17368N2», etc. Como observarán los expertos en la técnica, un anticuerpo con un isotipo de Fc particular puede convertirse en un anticuerpo con un isotipo de Fc distinto (p. ej., un anticuerpo con un Fc de IgG1 de ratón puede convertirse en un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (lo que incluye las CDR) – que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1 – siguen siendo los mismos y se espera que las propiedades de unión al antígeno sean idénticas o sustancialmente similares sin importar la naturaleza del dominio Fc.

En determinadas modalidades, los anticuerpos seleccionados con un Fc de IgG1 de ratón se convirtieron en anticuerpos con Fc de IgG4 humana. En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende un Fc de IgG4 humana con 2 o más cambios de aminoácido como se describe en la publicación de patente estadounidense n.° 20100331527 (incorporada la presente en su totalidad). En una modalidad, el dominio Fc de IgG4 comprende una mutación serina a prolina en la región bisagra (S108P) para promover la estabilización de dímero.

La Tabla 3 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de secuencias de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpos seleccionados de la presente descripción.

Tabla 3: Identificadores de secuencia de cadena pesada y cadena ligera

	SEQ ID NO (polpéptido)		SEQ ID NO (ADN)		
Designación del anticuerpo	**Cadena pesada**	**Cadena ligera**	**Cadena ligera**	**Cadena ligera**	**Isotipo Fc**
mAb24955N	18	20	17	19	IgG4 con función efectora reducida*
mAb24956N	38	40	37	39	IgG4 con función efectora reducida*
mAb24958N	58	60	57	59	IgG4 con función efectora reducida*
mAb24959N	78	80	77	79	IgG4 con función efectora reducida*
mAb28042P	98	100	97	99	IgG4 con función efectora reducida*
mAb28035P	118	120	117	119	IgG4 con función efectora reducida*
mAb28037P2	138	140	137	139	IgG4 con función efectora reducida*
mAb28075P	158	160	157	159	IgG4 con función efectora reducida*
mAb28105P	176	178	175	177	IgG4 con función efectora reducida*
mAb28113P	192	194	191	193	IgG4 con función efectora reducida*
mAb28128P	207	209	206	208	IgG4 con función efectora reducida*
mAb29814P	226	228	225	227	IgG4 con función efectora reducida*
mAb24955N2	246	248	245	247	IgG2a
mAb29822	266	268	265	267	IgG4 con función efectora reducida*

* Como se describió, por ejemplo, en la patente estadounidense 9,359,437.

Ejemplo 3: Constantes cinéticas y afinidades de unión derivadas de resonancia de plasmones superficiales de anticuerpos monoespecíficos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 monoclonales humanos

Las afinidades de unión y constantes cinéticas de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 humanos se determinaron mediante resonancia de plasmones superficiales en tiempo real (SPR; Biacore 4000 de GE Healthcare Life Sciences, o MASS-1 de Sierra Sensors) a 25 °C y 37 °C. Los anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 analizados en este ejemplo fueron aglutinantes monoespecíficos bivalentes para HLA-A2: NY-ESO-1 (expresados con una región constante (p. ej., una región constante de hIgG4) con función efectora reducida (p. ej., como se describe en la patente estadounidense 9,359,437), con una región constante de hIgG2a, con una región constante de mIgG2a o con una región constante de mIgG1). Los anticuerpos de referencia 1, 2 y 3 se generaron a partir de los anticuerpos descritos en Stewart-Jones *et ál., Proc Natl Acad Sci USA* 106(14):5784-5788 (2009) y en la publicación de patente internacional n.º WO2010106431. El anticuerpo de referencia 1 comprende los dominios VH y VL del anticuerpo 3M4E5 descrito en esas publicaciones con una Fc de IgG1 humana y una cadena ligera lambda humana; el anticuerpo de referencia 2 comprende el dominio VH de 3M4E5 y el dominio VL de Fab T1 de las publicaciones con un Fc de IgG1 humana y una cadena ligera lambda humana; el anticuerpo de referencia 3 comprende el dominio VH de 3M4E5 y el dominio VL de Fab T1 de las publicaciones con una IgG4 humana con Fc con función efectora reducida (como se describe en la patente estadounidense 9,359,437) y un dominio de VL lambda humano. Los anticuerpos se capturaron en una superficie de sensor CM5 Biacore (GE Healthcare Life Sciences) derivatizada mediante acoplamiento de amina con un anticuerpo de Fc anti-humano monoclonal (Jackson Immunoresearch) o una superficie de sensor de amina de alta capacidad (Sierra Sensors) derivatizada mediante acoplamiento de amina con anticuerpo de Fc anti-ratón policlonal (GE Life Sciences). Diversas concentraciones de complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1(156-165) monomérico (SEQ ID NO: 270 o 291; V en la posición 165), 2906 (SEQ ID NO: 272); se inyectaron sobre superficie capturada de anticuerpo anti-HLA-A2:(NY-ESO-1 a una velocidad de flujo de 50µL/minuto (MASS-1) o 30µL/minuto (Biacore 4000). La asociación anticuerpo-reactivo se controló durante 4-5 minutos y la disociación se controló durante 10 minutos. Todos los estudios de unión se realizaron en un amortiguador HBS-ET (HEPES 0.01 M pH 7.4; NaCl 0.15 M, EDTA 3 mM, 0.05 % v/v de tensioactivo P20).

Se determinaron las constantes de asociación (*k*a) y disociación (*k*d) cinética ajustando los sensogramas en tiempo real a un modelo de unión 1:1 utilizando el software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (*K*D) y las semividas de

disociación (t½) se calcularon a partir de las constantes de tasas cinéticas como:

$$K_D\ (M) = (kd/ka) \qquad y \qquad t½\ (min) = ((\ln_{(2)})/(60*kd))$$

Los parámetros cinéticos de unión para los anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 monoespecíficos al complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 monomérico se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Afinidades de unión Biacore de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 a 25 °C.

	25 °C			
Anticuerpo	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**	**t1/2 (min)**
mAbm24955N	5.69E+05	1.29E-03	2.27E-09	9.0
mAb24956N	9.43E+05	3.65E-04	3.87E-10	31.6
mAb24958N	6.37E+04	1.77E-04	2.77E-09	65.4
mAb24959N	4.21E+05	5.17E-04	1.23E-09	22.3
mAb28035P	4.45E+05	1.52E-04	3.42E-10	75.9
mAb28037P2	4.43E+05	3.07E-04	6.92E-10	37.7
mAb28042P	3.62E+05	1.99E-04	5.50E-10	58.0
mAb28075P	9.07E+05	3.52E-04	3.88E-10	32.8
mAb28105P	4.76E+05	1.84E-04	3.86E-10	62.8
mAb28113P	5.10E+05	3.26E-04	6.39E-10	35.5
mAb28128P	1.16E+06	1.85E-04	1.60E-10	62.5
Anticuerpo de referencia 1	4.77E+05	2.19E-03	4.60E-9	5.3
Anticuerpo de referencia 2	6.81E+05	6.69E-04	9.82E-10	17.3
Anticuerpo de referencia 3	7.35E+05	7.05E-04	9.58E-10	16.4

Tabla 5: Afinidades de unión Biacore de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 a 37 °C.

	37 °C			
Anticuerpo	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**	**t1/2 (min)**
mAb28035P	6.69E+05	2.53E-04	3.78E-10	45.7
mAb28037P2	6.64E+05	1.83E-03	2.76E-09	6.3
mAb28042P	5.61E+05	1.17E-03	2.09E-09	9.9
mAb28075P	1.26E+06	1.27E-03	1.00E-09	9.1

	37 °C			
Anticuerpo	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**KD (M)**	**t1/2 (min)**
mAb28105P	9.23E+05	5.41E-04	5.86E-10	21.3
mAb28113P	7.51E+05	1.46E-03	1.94E-09	7.9
mAb28128P	1.50E+06	4.41E-04	2.93E-10	26.2
Anticuerpo de referencia 1	8.81E+05	4.82E-03	5.47E-09	2.4
Anticuerpo de referencia 2	1.36E+06	1.84E-03	1.41E-09	6.3
Anticuerpo de referencia 3	1.16E+06	1.94E-03	1.72E-09	6.0

Los datos demuestran que una mayoría de los anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 analizados de manera selectiva se unieron al complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 soluble, algunos exhibieron afinidad nanomolar o subnanomolar y muchos tuvieron una mayor afinidad para el complejo que los anticuerpos de referencia.

Ejemplo 4: Unión FACS de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 contra linfocitos T2 pulsados con el péptido de NY-ESO-1_157-165

La unión relativa de anticuerpos de NY-ESO-1:157-165 se evaluó mediante citometría de flujo en linfocitos T2 (174 CEM.T2) pulsados con un péptido de NY-ESO-1_157-165 (C165) (SEQ ID NO: 269). Para pulsar, los linfocitos T2 (174 CEM.T2) se volvieron a suspender en medio AIM V a una densidad de $1x10^6$ células/ml (Gibco. Cat n.º 31035-025). Las células se pulsaron al agregar 10 µg/ml de hB2M (EMD Millipore Cat n.º 475828) y 100 µg/ml del péptido indicado. Luego los linfocitos T2 se incubaron durante la noche a 37 ºC, se lavaron en amortiguador de tinción y luego se tiñeron.

Para teñir las células, las células se cosecharon de los matraces usando amortiguador de disociación celular (Millipore, Cat n.º S-004-C) y se contaron. Las células se colocaron en placas en amortiguador de tinción (PBS, sin calcio y magnesio (Corning, Ref. n.º 21-031-CV) + 2 % de FBS (Seradigm, Lote n.º 238B15) a una densidad de 200,000 células por pocillo en una placa de fondo en V de 96 pocillos y se tiñeron con diluciones en serie de tres veces (1.7 pM - 100 nM) de anticuerpos primarios durante 30 minutos a 4 ºC. Luego de la incubación con anticuerpo primario, las células se lavaron una vez en amortiguador de tinción y se tiñeron con anticuerpo secundario conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch, Cat n.º 109-136-170) a 5 µg/ml durante 30 minutos a 4 ºC. A continuación, las células se lavaron y fijaron usando una solución al 50 % de

Cytofix (BD, Cat. n.º 554655). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo IntelliCyt iQue para calcular intensidad promedio de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés). Los valores de MFI se graficaron en Graphpad Prism usando una ecuación logística de cuatro parámetros en una curva de respuesta de 12 puntos para calcular los valores de EC_{50}. El anticuerpo secundario solo (es decir, sin anticuerpo primario) para cada curva de respuesta a la dosis también se incluye en el análisis como una continuación de la dilución en serie en tres veces y se representa como la dosis menor. El anticuerpo de referencia 2 y el anticuerpo de referencia 3, como se describieron anteriormente, se usaron como controles. Los valores de EC_{50} (M) se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Unión por FACS de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1

Anticuerpo	**EC_{50} (M) de NY-ESO-1_157-165) pulsado con T2**
mAb24955N	6.00E-10
mAb24956N	4.70E-10
mAb24958N	1.90E-08
mAb24959N	1.10E-09
mAb28035P	2.70E-09
mAb28037P2	7.80E-10
mAb28042P	1.60E-09
mAb28075P	3.80E-10
mAb28105P	1.80E-09
mAb28113P	6.00E-10
mAb28128P	3.20E-10
mAb29814P	1.10E-09
mAb29822P2	5.40E-09
Anticuerpo de referencia 2	2.20E-10
Anticuerpo de referencia 3	4.90E-10

Ejemplo 5: Unión por FACS de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 contra linfocitos T2 pulsados con péptidos de fuera de la diana previstos

La especificidad de unión de los anticuerpos de NY-ESO-1:157-165 se evaluó mediante citometría de flujo en linfocitos T2 (174 CEM.T2) pulsados con un péptido de NY-ESO-1(157-165) (C165;

SEQ ID NO: 269) o péptidos fuera de la diana previstos (Tabla 7). Para pulsar, los linfocitos T2 (174 CEM.T2) se volvieron a suspender en medio AIM V a una densidad de $1x10^6$ células/ml (Gibco. Cat n.º 31035-025). Las células se pulsaron al agregar 10 µg/ml de hB2M (EMD Millipore Cat n.º 475828) y 100 µg/ml del péptido indicado. Luego los linfocitos T2 se incubaron durante la noche a 37 °C, se lavaron en amortiguador de tinción y se tiñeron con los anticuerpos indicados a una concentración de 10 µg/ml siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Los valores de MFI se calcularon y se presentaron como una relación de linfocitos T2 pulsados a células no pulsadas. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 8. La carga de péptidos eficaz se determinó al comparar el aumento en la tinción de superficie con HLA-A2 de una línea celular pulsada a una línea celular sin pulsar usando un anticuerpo anti-HLA-A2. Cualquier aumento de 1.4 veces o mayor se consideró cargada con péptido. La carga no se pudo confirmar para un péptido (ITCH (807-815)); sin embargo los dos mAb de NY-ESO-1 de comparación, anticuerpo de referencia 1 y anticuerpo de referencia 2, como se describió en la presente, se unieron a células pulsadas con este péptido, lo que indica que una cantidad de péptido se cargó en las células.

Tabla 7: Péptido de NY-ESO-1_157-165 y péptidos fuera de la diana previstos.

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos del péptido
NY-ESO-1:157-165, wt	SLLMWITQC (SEQ ID NO: 269)
BCL9L: 1351-1359	SLLMWLTPL (SEQ ID NO: 273)
GRID1: 7-15	WLLPWICQC (SEQ ID NO: 274)
EARS2: 306-314	SLLDIITNC (SEQ ID NO: 275)
ZDHHC1 (376-384)	LLAMWGPQA (SEQ ID NO: 276)
ITCH (807-815)	KQIMWFWQF (SEQ ID NO: 277)
MAGEH1:90-98	SLLMSILAL (SEQ ID NO: 278)
FBXL22:4-12	LLTMHITQL (SEQ ID NO: 279)
URB1:1853-1861	SLLTWILHI (SEQ ID NO: 280)
NY-ESO-1:157-165, C165V	SLLMWITQV (SEQ ID NO: 281)
NY-ESO-1:157-165, C165V, S157A	ALLMWITQV (SEQ ID NO: 282)
NY-ESO-1:157-165, C165V, L158A	SALMWITQV (SEQ ID NO: 283)
NY-ESO-1:157-165, C165V, L159A	SLAMWITQV (SEQ ID NO: 284)
NY-ESO-1:157-165, C165V, M160A	SLLAWITQV (SEQ ID NO: 285)
NY-ESO-1:157-165, C165V, W161A	SLLMAITQV (SEQ ID NO: 286)

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos del péptido
NY-ESO-1:157-165, C165V, I162A	SLLMWATQV (SEQ ID NO: 287)
NY-ESO-1:157-165, C165V, T163A	SLLMWIAQV (SEQ ID NO: 288)
NY-ESO-1:157-165, C165V, Q164A	SLLMWITAV (SEQ ID NO: 289)
NY-ESO-1:157-165, C165A	SLLMWITQA (SEQ ID NO: 290)

Tabla 8: Relación de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que se unen a linfocitos T2 pulsados con péptido fuera de la diana a células sin pulsar

Anticuerpo	Relación NY-ESO-1:157-165 wt a sin pulsar	Relación BCL9L: 1351-1359 a sin pulsar	Relación GRID1: 7-15 a sin pulsar	Relación EARS2: 306-314 a sin pulsar	Relación ZDHHC1 (376-384) a sin pulsar	Relación ITCH (807-815) a sin pulsar	Relación MAGEH1: 90-98 a sin pulsar	Relación FBXL22:4-12 a sin pulsar	Relación URB1:1853-1861 a sin pulsar
mAb24955N	110.1	0.4	1.1	0.6	0.4	1	0.5	0.5	0.6
mAb24956N	124.8	0.4	1	0.6	0.4	0.9	0.4	0.5	0.5
mAb24958N	98.6	0.4	0.7	0.6	0.4	1	0.5	0.5	0.6
mAb24959N	131	80.7	3.2	0.6	0.4	0.9	0.4	0.5	0.6
mAb28035P	131.4	170.1	1.4	0.6	0.9	1	0.4	0.5	0.5
mAb28037P2	136.6	52.3	0.7	0.6	0.5	1.3	0.4	0.5	0.6
mAb28042P	134.2	46.5	17.4	0.6	0.5	0.7	0.4	0.5	0.5
mAb28075P	58.8	1.5	1.4	0.5	0.4	1	0.5	0.5	0.5
mAb28105P	126.4	0.4	0.7	0.6	0.5	1	0.5	0.5	0.6
mAb28113P	114.7	1	0.9	0.5	0.4	0.9	0.4	0.5	0.6
mAb28128P	138.4	3	1.6	0.6	1.6	1	0.5	1.3	0.6
mAb29814P	124	150.1	1.6	0.6	0.6	0.9	0.4	0.5	7.9
mAb29822P2	36.7	0.8	0.7	0.5	0.3	0.8	0.4	0.4	0.4
anti-NY-ESO-1 3M4E5_VH.hIgG1T1_Fab_VL.hLambda_opt	102.2	146.9	22.8	0.6	25.6	10.5	0.6	1.1	141.8
anti-NY-ESO-1 3M4E5_VH.hIgG4sT1_Fab_VL.hLambda_opt	137.6	174.3	21	0.7	30.3	9.4	0.6	0.8	171.9

Isotipo de control de IgG4s humana	0.7	1.4	0.7	0.6	1	1	0.5	0.6	2.4
anti-HLA-A2	2.1	2.8	1.4	2.6	1.8	0.5	2.3	2.2	2.9
Isotipo de control de IgG2a humana	0.6	1.1	1.7	1.9	1.1	0.8	1.7	1.5	2.1
Isótopo de control de IgG1 humana	0.8	1.1	0.8	0.6	0.8	0.9	0.5	0.6	1.5
Anti-hFC	0.7	0.4	0.8	0.6	0.5	1	0.6	0.6	0.7
Anti-mFC	1.9	0.8	1.0	0.9	1.0	1.1	0.7	0.9	0.9
Sin tinción	0.9	0.9	1.1	1.1	1.1	1	1.1	1	0.8

Como se muestra en la Tabla 8, una cantidad de los anticuerpos analizados se identificaron como que no tienen unión significativa en linfocitos T2 pulsados con cualquiera de los péptidos fuera de la diana previstos, especialmente en comparación con los dos anticuerpos comparadores, que exhibieron unión significativa a múltiples péptidos fuera de la diana. La unión no específica puede conducir a una menor eficacia terapéutica y/o un aumento de los efectos adversos (p. ej., citotoxicidad no específica que disminuye la actividad de eliminación de células tumorales y/o ocasiona efectos secundarios en sujetos). Por lo tanto, la identificación de proteínas de unión al antígeno (p. ej., anticuerpos) que tienen unión fuera de la diana mínima puede ser ventajoso para desarrollar agentes terapéuticos que se dirigen a MAGE-A4, como se describe en la presente.

El análisis de alanina se realizó para determinar qué residuos en el péptido de NY-ESO-1(157-165) fueron importantes para la unión celular. Los linfocitos T2 se pulsaron con péptidos de análisis de alanina (Tabla 7) y se tiñeron con los anticuerpos de NY-ESO-1 (157-165) como se describió anteriormente. El cambio múltiplo sobre las células sin pulsar se exhibe en la tabla 9. Todos los péptidos se cargaron de manera eficaz según se determinó mediante tinción de la superficie de HLA.A2 (descrita anteriormente) salvo por NY-ESO-1:157-165, C165V, S157A y NY-ESO-1:157-165, C165V, I162A. Los siguientes residuos fueron importantes para la unión de los mAb anti-NY-ESO-1 analizados (definidos como una reducción de unión del 90 % o mayor): leucina 158, triptófano 161, treonina 163 y glutamina 164. Treonina 163 y glutamina 164 fueron dispensables para la unión del anticuerpo monoclonal comparador, anticuerpo de referencia 3, como se describió anteriormente. La metionina 160 fue particularmente importante para la unión de mAb24956N, mAb24958N y mAb28105P.

Tabla 9: Relación de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 que se unen a linfocitos T2 pulsados con péptidos de análisis de alanina a células sin pulsar

mAb	NY-ESO-1 (SLLM WITQV (SEQ ID NO: 281))	S157A (ALLM WITQV (SEQ ID NO: 282))	L158A (SALM WITQV (SEQ ID NO: 283))	L159A (SLAM WITQV (SEQ ID NO: 284))	M160A (SLLA WITQV (SEQ ID NO: 285))	W161A (SLLM AITQV (SEQ ID NO: 286))	I162A (SLLMW ATQV (SEQ ID NO: 287))	T163A (SLLM WIAQV (SEQ ID NO: 288))	Q164A (SLLM WITAV (SEQ ID NO: 289))	C165A (SLLM WITQA (SEQ ID NO: 290))
mAb24955N	29.8	0.5	0.6	23.0	16.3	0.4	1.1	0.9	1.0	66.1
mAb24956N	32.6	0.4	0.4	27.8	0.7	0.4	0.7	1.7	0.8	53.5
mAb24958N	46.8	1.2	8.6	29.8	2.0	0.4	0.3	0.4	2.0	45.2
mAb28075P	29.3	1.6	5.1	25.0	27.1	0.4	2.3	7.5	2.1	25.4
mAb28105P	35.4	2.5	7.7	40.1	8.5	0.4	5.2	14.2	3.2	62.1
mAb28113P	44.6	2.5	7.6	34.5	27.9	0.4	5.0	16.0	9.1	45.1
mAb29822P2	5.3	0.3	0.3	10.3	10.3	0.4	0.3	0.4	0.4	14.2
anticuerpo de referencia 3	67.2	3.6	11.3	51.8	68.0	0.4	7.4	47.0	67.1	68.1
anti-HLA-A2	3.4	1.2	2.7	4.1	3.9	3.5	1.3	3.1	3.4	3.5
IgG4 humana con isotipo de control con función efectora reducida	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
FC anti-ratón	0.5	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4

FC anti-humano	0.8	1.2	0.7	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7	0.8	0.8
Viabilidad	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.9	0.9

Ejemplo 6: Reformateo de anticuerpos anti-HLA-A2:NY-ESO-1 en ScFv para uso en receptores de antígeno quimérico

Se reformatearon cuatro anticuerpos de NY-ESO-1(157-165) (mAb24955N, mAb24956N, mAb24958N y mAb24959N) en receptores de antígeno quimérico (CAR) de fragmento variable de cadena simple VL-VH o VH-VL usando una bisagra de CD8α y un dominio transmembrana, dominio coestimulador 4-1BB y un dominio coestimulador CD3ζ. Los CAR de NY-ESO-1:157-165 se clonaron en un vector de expresión lentiviral (Lenti-X™ Bicistronic Expression System (Neo), Clontech Cat n.º 632181) y se generaron partículas lentivirales mediante el sistema Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech Cat n.º 631276) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Luego se transdujeron células Jurkat/NFATLuc cl. 3C7 (células para expresar un indicador de NFAT-luciferasa) con los 8 CAR diferentes usando RetroNectin Precoated Dishes (Clontech, Cat n.º T110a) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Luego de la selección durante al menos 2 semanas en 500 µg/ml de G418 (Gibco, Cat n.º 11811-098), se generaron las siguientes líneas de linfocitos T-CAR: Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VL-VH; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VL-VH; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VL-VH; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VH-VL; y Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VL-VH. Luego se evaluó la actividad de líneas de linfocitos T-CAR en un bioensayo de CAR-T/APC (célula presentadora de antígeno). Para realizar el bioensayo, se agregaron 50,000 linfocitos T-CAR a placas blancas de 96 pocillos Thermo-Nunc (Thermo Scientific, Cat n.º 136101) en 50 ml de medio de ensayo (medio RPMI con 10 % de FBS y 1 % de P/S/G) seguido por la adición de una dilución en serie en 3 veces de APC (200,000 células a 274 células) en 50 ml de medio de ensayo. Se utilizaron las siguientes APC: 3T3/HLA.A2/hB2M/NY-ESO-1: 157-165 WT (células NIH3T3 modificadas para expresar HLA.A2 humano (número de acceso P01892), B2M humano (número de acceso NP_004039.1) y un casete de péptido de ubiquitina que comprende el péptido de NY-ESO-1: 157-165, 3T3/HLA.A2/hB2M/HPV16E7 11-19 (como se describió anteriormente con un casete de péptido de ubiquitina (Lévy F, *et ál.* (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93(10):4907-4912; Valmori D*, et ál.* (1999) *J Exp Med.* 189(6):895-906) que comprende el péptido HPV16E7:11-19, IM9 (positivo para HLA.A2, positivo para NY-ESO-1: 157-165) y HEK293 (positivo para HLA.A2 y negativo para NY-ESO-1: 157-165). La mezcla celular se incubó en una

incubadora humidificada con CO_2 al 5 %, a 37 ºC durante 5 horas. La actividad de NFAT-Luciferasa se midió usando Promega One-Glo (Cat n.º E6130) y un lector de placas Perkin Elmer Envision. Se generaron unidades de luciferasa relativas (RLU, por sus siglas en inglés) y se graficaron en Graphpad Prism usando una ecuación logística de cuatro parámetros en una curva de respuesta de 8 puntos para calcular los valores EC_{50}. La condición de APC cero para cada curva de respuesta a la dosis también se incluye en el análisis como una continuación de la dilución en serie en tres veces y se representa como la dosis menor. La activación múltiple máxima se determinó al tomar la relación de la RLU mayor en la curva con la menor. Las ocho líneas celulares de CAR de NY-ESO-1 se activaron en presencia de células WT 3T3/HLA.A2/hB2M/NY-ESO-1: 157-165. Como se demostró en la Tabla 10, se activaron tres líneas celulares de CAR de NY-ESO-1 en presencia de células IM9 (Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VH-VL; Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VL-VH; y Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VL-VH).

Tabla 10: Activación de NY-ESO-1: 157-165 CAR-T en un bioensayo CAR-T/APC.

	3T3/HLA.A2/hB2M/NY-ESO-1 157-165 WT		**3T3/HLA.A2/hB2M/HPV16E7 11-19**		**IM9**		**HEK293**	
	EC50 (n.º de células APC)	**Múltiple máximo (RLU)**	**EC50 (n.º de células APC)**	**Múltiple máximo (RLU)**	**EC50 (n.º de células APC)**	**Múltiple máximo (RLU)**	**EC50 (n.º de células APC)**	**Múltiple máximo (RLU)**
Jurkat/NFATLuc cl 3C7	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VH-VL	20306	39	N.D.	1	84852	3	N.D.	1
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24955N VL-VH	88656	30.5	N.D.	1	253190	4.1	N.D.	0.8
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N VH-VL	47635	30.1	N.D.	1	N.D.	1.2	N.D.	0.8
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24956N	25855	38.1	N.D.	0.9	111502	4.4	N.D.	0.7

VL-VH								
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VH-VL	24506	6.7	N.D.	1.1	N.D.	1	N.D.	0.7
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24958N VL-VH	19871	6.4	N.D.	1	N.D.	0.9	N.D.	0.7
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VH-VL	14233	13.3	N.D.	1.1	N.D.	1.1	N.D.	0.7
Jurkat/NFATLuc cl 3C7/NY-ESO CAR-T 24959N VL-VH	24009	28.6	N.D.	0.9	N.D.	0.8	N.D.	0.6

Ejemplo 7: Análisis estructural de unión de Fab a HLA2:péptido de NY-ESO-1_157-165

Para entender mejor las interacciones específicas entre el anticuerpo y el complejo HLA-péptido, se determinó una estructura cristalina de rayos X para el fragmento Fab del anticuerpo mAb28105P unido a HLA-A2/hB2M que exhibe un péptido que comprende los residuos 157-165 del antígeno de cáncer testicular 1 (CTAG1B; NY-ESO-1). Este péptido se modificó al sustituir el residuo 165 de su cisteína natural con una valina. Los 9 residuos del péptido de NY-ESO-1 (C165V) presente en HLA se veían claramente en el mapa de densidad de electrones de esta estructura y los residuos de HLA y Fab que rodean el péptido también se resolvieron correctamente. Esta estructura se refinó en una solución de 3.3 Å, pero nuevas técnicas de refinamiento cristalográfico (red elástica deformable o refinamiento de «cuerpo de gelatina») ayudó a prevenir el sobreajuste, asegurando la precisión del modelo resultante.

El Fab mAb28105P se unió a la parte superior del complejo HLA-péptido, de manera similar a la forma que se une un TCR. Este Fab se centró en el péptido unido, con HCDR3 en contacto con la mitad del extremo C del péptido unido y las CDR de cadena ligera en contacto con la mitad del extremo N del péptido. Los residuos de péptido M160 y W161 se ubicaron en el centro de la interfaz de unión del Fab, haciendo contacto con los residuos de CDR tanto de la cadena ligera como pesada, como se describe más adelante. Otras estructuras del complejo del anticuerpo de péptido en ranura publicados (p. ej., códigos PDB 1W72 y 4WUU) revelaron que un anticuerpo no tiene que cubrir el péptido presente en HLA; sin embargo, los anticuerpos con solo cobertura de péptido parcial tienen mala especificidad, tolerando cambios considerables en la parte del péptido

que no está en contacto con poca pérdida en la afinidad de unión.

La estructura mostró que la cadena pesada de Fab mAb28105P estuvo en contacto con los residuos 160, 161 y 164 en el péptido de NY-ESO-1 unido a HLA, mientras que la cadena ligera de Fab estuvo en contacto con los residuos 160 y 161. Los residuos de péptido 157, 158, 159, 162, y 165 todos apuntaron hacia la molécula de HLA. El residuo 163 se cribó por completo del solvente mediante la cadena ligera de Fab, pero no hizo ningún contacto directo con los residuos del anticuerpo. El péptido unido se numeró de acuerdo con las posiciones de los residuos en la SEQ ID NO: 271), como se muestra en la SEQ ID NO: 291:

Aminoácido	S	L	L	M	W	I	T	Q	V
Posición	157	158	159	160	161	162	163	164	165

(SEQ ID NO: 291)

Todos los contactos de Fab se realizaron con las cadenas laterales del péptido unido a HLA, en vez de su estructura principal.

Los contactos de péptido realizados mediante Fab mAb28105P se concentraron en la HCDR3, con pequeñas contribuciones de la LCDR1 y la LCDR2. En particular, los residuos de cadena pesada de Fab 100, 101, 104, 105 y 111 (SEQ ID NO:162) y los residuos de cadena ligera 32 y 49 (SEQ ID NO:170) interactuaron con el péptido unido, mientras que los residuos de cadena pesada de Fab 100, 101, 107 y 109 (SEQ ID NO:162) y el residuo de cadena ligera 92 (SEQ ID NO:170) interactuaron con el HLA. Como se usó anteriormente, la expresión «interactúa con» en la presente puede incluir enlaces de hidrógeno directos o mediados por agua, interacciones carga-carga o interacciones hidrofóbicas/van der Waals.

Cuatro de los anticuerpos de NY-ESO-1_157-165 (mAb24955N, mAb24956N, mAb24958N y mAb24959N) fueron muy similares en una secuencia de cadena ligera, pero las secuencias de cadena pesada divergieron en la HCDR2 y la HCDR3. Los siete residuos de unión al péptido se conservaron generalmente: tres residuos fueron idénticos en los cuatro anticuerpos y tres más fueron idénticos en tres de cuatro secuencias, lo que sugiere una modalidad de unión común entre los anticuerpos.

Ejemplo 8: Análisis de los dominios de señalización del receptor de antígeno quimérico

Los receptores de antígeno quimérico que contienen scFv anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ en la orientación V_H-V_L más 1) un dominio transmembrana/bisagra CD8 (huCD8), un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3zeta (BB/z CAR) (secuencia CAR de longitud completa: SEQ ID NO: 301) o 2) dominios coestimuladores/transmembrana/bisagra huCD28 y un dominio de señalización CD3z (28/z CAR) (secuencia CAR de longitud completa: SEQ ID NO: 302) se construyeron usando las secuencias V_L y V_H de un anticuerpo anti-HLA-

A2/NY-ESO-$1_{157-165}$, mAb28105P (V_L: SEQ ID NO: 294; V_H: SEQ ID NO: 293). Como un control sin unión, se diseñó un CAR de BB/z usando un scFv irrelevante más un dominio transmembrana/bisagra huCD8, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3z. Estos CAR se clonaron en un vector lentiviral pLVX con un promotor EF1a y una secuencia P2A:eGFP (SEQ ID NO: 300) para rastrear células transducidas por CAR y se produjo lentivirus pseudotipado con VSV. Ver la Figura 1A para el diseño de la construcción: y la Tabla 11 para un resumen de las construcciones.

Los linfocitos T CD3+ se aislaron de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas de un donante normal, estimulados con microperlas de CD3/CD28 más 100 U/ml de IL-2 humano recombinante y transducidos con el lentivirus en un MOI=5. Las células transducidas se expandieron durante 19 días con microperlas de CD3/CD28 más 100 U/ml de IL-2 humana recombinantes antes de crioconservarse hasta el uso durante el experimento *in vivo*.

Para determinar la eficacia *in vivo* de linfocitos T del receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigida a anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$, se realizó un tumor xenogénico. El día 0, los ratones NOD.Cg-$Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}$/SzJ (NSG) inmunodeficientes se inyectaron de manera subcutánea con $5x10^6$ de células tumorales HLA-$A2^+$NY-ESO-1^+ A375 de melanoma humano. El día 3 después de que los tumores se establecieron, a los ratones (n=5 por grupo) se les inyectó de manera intravenosa $20x10^6$ de linfocitos T que expresan el CAR de BB/z de control sin unión (Control CAR T), el CAR de BB/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ o el CAR de 28/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ (según se determina mediante la frecuencia de células que expresan GFP, que es un marcador para aquellas células que se transdujeron con CAR) de dos donantes diferentes. El crecimiento tumoral se evaluó hasta el día 21 al medir los volúmenes tumorales.

Para determinar el volumen tumoral mediante calibre externo, se determinaron el mayor diámetro longitudinal (longitud en mm) y el mayor diámetro transversal (ancho en mm). Se calcularon los volúmenes tumorales en función de mediciones de calibre mediante la fórmula: Volumen (mm^3) = (longitud × $ancho^2$)/2.

Tabla 11: Construcciones de CAR

mAb original	Especificidad	Descripción

Irrelevante	Control sin unión	scFv anti-HLA-A2/HPV16E7$_{11-19}$ scFv en orientación VL-VH con dominio transmembrana/bisagra huCD8, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3z (CAR de control)
mAb28105P	HLA-A2/NY-ESO-1$_{157-165}$	mAb28105P de scFv anti-HLA-A2/NY-ESO-1$_{157-165}$ en orientación VH-VL con dominio transmembrana/bisagra huCD8, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3z (NY-ESO-1$_{157-165}$ BB/z CAR)
mAb28105P	HLA-A2/NY-ESO-1$_{157-165}$	mAb28105P de scFv anti-HLA-A2/NY-ESO-1$_{157-165}$ en orientación VH-VL con dominios coestimulador/transmembrana/bisagra huCD28 y un dominio de señalización CD3z (CAR 28/z de NY-ESO-1$_{157-165}$)

En su conjunto, los resultados demuestran que los linfocitos T de CAR 28/z anti-HLA-A2/NY-ESO-1$_{157-165}$ demuestran cinética antitumoral y actividad antitumoral *in vivo* superior en comparación con los linfocitos T de CAR BB/z anti-HLA-A2/NY-ESO-1$_{157-165}$, pero que ambos tipos de CAR demostraron actividad antitumoral en comparación con el control sin unión. Los tumores A375 crecieron de manera progresiva en ratones que reciben linfocitos T de CAR de control. Los ratones que reciben linfocitos T de CAR BB/z anti-HLA-A2/NY-ESO-1$_{157-165}$ demostraron algo de control

tumoral, con una reducción en el crecimiento tumoral en comparación con ratones tratados con T de CAR de control los días 21 ($p<0.04$), 28 ($p<0.0001$) y 38 ($p<0.0001$) (estadísticas analizadas mediante ANOVA bidireccional). El tratamiento con T de CAR 28/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ también condujo a la supresión del crecimiento de tumor A375 establecido los días 16 ($p=0.03$), 19 ($p=0.0002$), 21 ($p<0.0001$), 28 ($p<0.0001$) y 38 ($p<0.0001$) (estadísticas analizadas mediante ANOVA bidireccional). Se confirmó la eficacia mejorada de CAR de 28/z anti-HLA-A2/NY-ESO-$1_{157-165}$ en comparación con CAR de BB/z anti-HLA-A2/NY-ESO-1157-165, dado que los tamaños del tumor los días 21 ($p=0.002$), 28 ($p<0.0001$) y 38 ($p<0.0001$) son estadísticamente significativos, ($p<0.0001$ ambos días) mediante ANOVA bidireccional. Ver la Figura 1B y la Figura 1C y Tablas 12-22.

Tabla 12: eficacia de CAR, día 3

Tratamiento con T de CAR	**Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 3**	**Error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés) del tamaño del tumor**	**Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 3**
T de CAR de control	57.2	7.1	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	69.1	11.4	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	79.4	4.0	5

Tabla 13: eficacia de CAR, día 5

Tratamiento con T de CAR	**Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 5**	**Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor**	**Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 5**
T de CAR de control	78.8	7.0	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	65.9	10.9	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	80.7	8.0	5

Tabla 14: eficacia de CAR, día 7

Tratamiento con T de CAR	**Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 7**	**Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor**	**Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 7**

T de CAR de control	118.4	12.2	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	69.8	8.4	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	77.6	7.1	5

Tabla 15: eficacia de CAR, día 10

Tratamiento con T de CAR	Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 10	Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor	Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 10
T de CAR de control	134.0	12.1	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	81.8	10.4	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	43.7	2.5	5

Tabla 16: eficacia de CAR, día 12

Tratamiento con T de CAR	Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 12	Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor	Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 12
T de CAR de control	224.6	23.7	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	92.1	12.0	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	43.8	8.1	5

Tabla 17: eficacia de CAR, día 14

Tratamiento con T de CAR	Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 14	Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor	Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 14
T de CAR de control	281.8	31.8	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	98.3	16.4	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	56.6	5.6	5

Tabla 18: eficacia de CAR, día 16

Tratamiento con T de CAR	Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 16	Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor	Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 16
T de CAR de control	409.8	44.5	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	157.9	16.7	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	70.5	6.0	5

Tabla 19: eficacia de CAR, día 19

Tratamiento con T de CAR	Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 19	Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor	Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 19
T de CAR de control	657.3	81.3	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	359.8	41.9	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	106.6	14.5	5

Tabla 20: eficacia de CAR, día 21

Tratamiento con T de CAR	Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 21	Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor	Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 21
T de CAR de control	943.1	110.5	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	607.6	57.8	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	142.7	12.6	5

Tabla 21: eficacia de CAR, día 28

Tratamiento con T de CAR	Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 28	Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor	Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 28
T de CAR de control	2168.4	162.9	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	1351.5	154.6	5

T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	523.8	57.7	5

Tabla 22: eficacia de CAR, día 38

Tratamiento con T de CAR	**Tamaño medio del tumor (mm^3) el día 38**	**Error estándar de la media (SEM) del tamaño del tumor**	**Cantidad de ratones vivos (de 5) el día 38**
T de CAR de control	3904.3	157.4	5
T de CAR de BB/z NY-ESO-$1_{157-165}$	2754.3	443.7	5
T de CAR de 28/z NY-ESO-$1_{157-165}$	1696.4	144.0	5

El alcance de la presente invención no se limita a las modalidades específicas descritas en la presente. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las que se describen en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede y las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

Se reivindica lo siguiente:

1. Una proteína de unión al antígeno que se une específicamente a un complejo HLA-A2:péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (péptido de NY-ESO-1) en al menos un aminoácido que corresponde a un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en M160, W161 y Q164 de la SEQ ID NO: 271.

2. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 1, en donde dicha proteína de unión al antígeno aislada se une específicamente a un epítopo conformacional del polipéptido del NY-ESO-1 presentado por HLA-A2.

3. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho al menos un aminoácido es al menos dos aminoácidos.

4. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 3, en donde dicho al menos un aminoácido es tres aminoácidos.

5. Una proteína de unión al antígeno que se une específicamente a un complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165, en donde dicha proteína de unión al antígeno aislada interactúa con los aminoácidos M160, W161 y Q164 de dicho péptido de NY-ESO-1 157-165 como se determina mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 4.0 Å o mayor.

6. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 5, en donde dicha resolución es 3.5 Å o mayor.

7. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 6, en donde dicha resolución es 3.3 Å o mayor.

8. Una proteína de unión al antígeno que se une específicamente a un complejo de HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165, pero no se une específicamente a uno o más péptidos fuera de la diana que se seleccionan del grupo que consiste en BCL9L 1351-1359 (SEQ ID NO: 273), GRID1 7-15 (SEQ ID NO: 274), ZDHHC1 376-384 (SEQ ID NO: 276), ITCH 807-815 (SEQ ID NO: 277) y URB1 1853-1861 (SEQ ID NO: 280), en donde la relación de i) dicha proteína de unión al antígeno que se une a las células pulsadas con dicho uno o más péptidos fuera de la diana y ii) células sin pulsar es menor que alrededor de nueve.

9. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 8, en donde dicha relación es menor que alrededor de 8.

10. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 9, en donde dicha relación es menor que alrededor de 7.

11. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 10, en donde dicha relación es menor que alrededor de 6.

12. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 11, en donde dicha relación es menor que alrededor de 5.

13. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 12, en donde dicha relación es menor que alrededor de 4.

14. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 13, en donde dicha relación es menor que alrededor de 3.

15. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 14, en donde dicha relación es menor que alrededor de 2.

16. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde dicha proteína de unión al antígeno se une a un complejo HLA-A2:péptido de NY-ESO-1 157-165 monomérico con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de unión de menos de alrededor de 1 nM según se mide en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales a 25 °C.

17. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde dicho péptido de NY-ESO-1 comprende la secuencia de aminoácidos de SLLMWITQC (SEQ ID NO: 269) o SLLMWITQV (SEQ ID NO: 291).

18. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo de longitud completa, un Fab, un Fab', un (Fab')2, un Fv, un Fv de cadena simple (scFv), una construcción de cuerpo T o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

19. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 19, en donde la proteína de unión al antígeno es un CAR.

20. El CAR de la reivindicación 19, en donde el CAR comprende una región variable de cadena pesada (LCVR), una región variable de cadena ligera (LCVR), una región bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador y un dominio de señalización.

21. El CAR de la reivindicación 20, en donde el dominio coestimulador es un dominio coestimulador 4-1BB.

22. El CAR de la reivindicación 20, en donde el dominio coestimulador es un dominio coestimulador CD28.

23. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la proteína de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento de unión al antígeno de este.

24. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de la región

variable de cadena pesada (HCVR) enumeradas en la Tabla 1 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera (LCVR) enumeradas en la Tabla 1.

25. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 24, en donde dichas secuencias de la HCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 22, 42, 142 y 250.

26. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 24, en donde dichas secuencias de la LCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 30, 50, 150 y 260.

27. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 24, en donde dichas secuencias de HCVR/LCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 y 250/258.

28. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 24, en donde dichas secuencias de HCVR/LCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 142/150 y 250/258.

29. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, que comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la HCVR enumeradas en la Tabla 1.

30. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 29, en donde dichas secuencias de la HCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 22, 42, 142 y 250.

31. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-30, que comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

32. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 31, en donde dichas secuencias de la LCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 30, 50, 150 y 260.

33. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende: (a) una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la HCVR enumeradas en la Tabla 1 y (b) una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

34. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 33, en donde dichas secuencias de HCVR/LCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 y 250/258.

35. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 34, en donde dichas secuencias de HCVR/LCVR se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 142/150 y 250/258.

36. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-35, que comprende:

(a) un dominio de la HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213, 232 y 252;

(b) un dominio de la HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 182, 199, 215, 234 y 254;

(c) un dominio de la HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217, 236 y 256;

(d) un dominio de la LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221, 240 y 260;

(e) un dominio de la LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174, 242 y 262; y

(f) un dominio de la LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224, 244 y 264.

37. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-28 y 36, en donde dicha proteína de unión al antígeno comprende una HCVR que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de la HCVR enumerada en la Tabla 1.

38. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 37, en donde dicha proteína de unión al antígeno comprende una HCVR que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de la HCVR enumerada en la Tabla 1.

39. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 38, en donde dicha proteína de unión al antígeno aislada comprende una HCVR que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de la HCVR enumerada en la Tabla 1.

40. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-28 y 36-39, en donde dicha proteína de unión al antígeno comprende una LCVR que comprende al menos un 80 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de la LCVR enumerada en la Tabla 1.

41. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 40, en donde dicha proteína de unión al antígeno aislada comprende una LCVR que comprende al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de la LCVR enumerada en la Tabla 1.

42. La proteína de unión al antígeno de la reivindicación 38, en donde dicha proteína de unión al antígeno comprende una LCVR que comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de la LCVR enumerada en la Tabla 1.

43. Una proteína de unión al antígeno que compite por unión con una proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-42.

44. Una proteína de unión al antígeno que se une al mismo epítopo que una proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-42.

45. La proteína de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-44 que comprende un resto detectable.

46. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión al antígeno que se une a HLA-A2:NY-ESO-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-45 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

47. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una HCVR de una proteína de unión al antígeno como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1-45.

48. Una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una LCVR de una proteína de unión al antígeno como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1-45.

49. Un vector que comprende la molécula de polinucleótido de la reivindicación 47 o 48.

50. Una célula que expresa la molécula de polinucleótido de la reivindicación 47 o 48, o el vector de la reivindicación 49.

51. Un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno asociado con NY-ESO-1 que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión al antígeno asociada como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1-45 o la composición farmacéutica de la reivindicación 46 o la célula de la reivindicación 50, tratando así al sujeto.

52. El método de la reivindicación 51, en donde la enfermedad o el trastorno asociado con NY-ESO-1 es un cáncer asociado con NY-ESO-1.

53. El método de la reivindicación 52, en donde el cáncer asociado con NY-ESO se selecciona del grupo que consiste en: un liposarcoma, un neuroblastoma, un mieloma, un melanoma metastásico, un sarcoma sinovial, un cáncer de vejiga, un cáncer del esófago, un cáncer hepatocelular, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de ovario, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, tumor astrocítico, glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, tumor cerebral, cáncer de trompas de Falopio, cáncer epitelial de ovario, cáncer de cavidad peritoneal primario, tumores sólidos avanzados, sarcoma de tejido blando, melanoma, un sarcoma, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma sinovial, tumores sólidos metastásicos, cáncer de esófago, rabdomiosarcoma, mixoide avanzado, liposarcoma de célula redonda, melanoma metastásico o cáncer de pulmón no microcítico recurrente.

54. El método de cualquiera de las reivindicaciones 51-53, en donde la proteína de unión al antígeno se administra al sujeto junto con un segundo agente terapéutico.

55. El método de la reivindicación 54, en donde el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de PD-1, un inhibidor de CTLA-4, un anticuerpo para un antígeno específico para el tumor, un anticuerpo para un antígeno de célula infectada por virus, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de CD20, un anticuerpo biespecífico contra CD20 y CD3, un complemento alimenticio tal como un antioxidante, un antagonista del VEGF, un agente quimoterapéutico, un agente citotóxico, cirugía, radiación, un AINE, un corticosteroide, y cualquier otra terapia útil para mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad o el trastorno.

56. El método de cualquiera de las reivindicaciones 51-55, en donde la proteína de unión al antígeno se administra por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, intramuscular o intracraneal.

57. El método de cualquiera de las reivindicaciones 51-56, en donde la proteína de unión al antígeno se administra en una dosis de alrededor de 0.1 mg/kg de peso corporal a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

58. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión extracelular que se une específicamente a un epítopo conformacional de un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (péptido de NY-ESO-1) presentado por HLA-A2, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular.

59. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 58, en donde el dominio de unión extracelular es una proteína de unión al antígeno anti-HLA-A2:NY-ESO-1.

60. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 59, en donde la proteína de unión al antígeno comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de la región variable de cadena pesada (HCVR) enumeradas en la Tabla 1 y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de cualquiera de las secuencias de región variable de cadena ligera (LCVR) enumeradas en la Tabla 1.

61. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-60, en donde la proteína de unión al antígeno comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la HCVR enumeradas en la Tabla 1.

62. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-61, en donde la proteína de unión al antígeno comprende una LCVR que tiene una secuencia de

aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

63. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-62, en donde la proteína de unión al antígeno comprende (a) una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la HCVR enumeradas en la Tabla 1 y (b) una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la LCVR enumeradas en la Tabla 1.

64. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-63, en donde la proteína de unión al antígeno comprende

(a) un dominio de la HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 24, 44, 64, 84, 104, 124, 144, 164, 213, 232 y 252;

(b) un dominio de la HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 26, 46, 66, 86, 106, 126, 146, 166, 182, 199, 215, 234 y 254;

(c) un dominio de la HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 28, 48, 68, 88, 108, 128, 148, 168, 184, 201, 217, 236 y 256;

(d) un dominio de la LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92, 112, 132, 152, 172, 188, 221, 240 y 260;

(e) un dominio de la LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 34, 54, 74, 94, 114, 134, 154, 174, 242 y 262; y

(f) un dominio de la LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 36, 56, 76, 96, 116, 136, 156, 190, 205, 224, 244 y 264.

65. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-64, en donde la proteína de unión al antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 62/70, 82/90, 102/110, 122/130, 142/150, 162/170, 180/186, 196/203, 211/219, 230/238 y 250/258.

66. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-65, en donde la proteína de unión al antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 42/50, 142/150 y 250/258.

67. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-66, que comprende cualquiera de las secuencias enumeradas en la Tabla 2.

68. La molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-67, en donde la proteína de unión al antígeno es un scFv.

69. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las

reivindicaciones 58-68.

70. Una célula efectora inmune aislada que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de las reivindicaciones 58-68 o el vector de la reivindicación 69.

71. La célula efectora inmune aislada de la reivindicación 70, que es un cuerpo T.

72. La célula efectora inmune aislada de la reivindicación 70 o 71, en donde dicha célula expresa dicho CAR.

73. Un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno asociado con NY-ESO-1, que comprende administrar al sujeto la célula efectora inmune de cualquiera de las reivindicaciones 70-72.

74. El método de la reivindicación 73, en donde la enfermedad o el trastorno asociado con NY-ESO-1 es cáncer asociado con NY-ESO-1.

75. El método de la reivindicación 73 o 74, en donde la proteína de unión al antígeno se administra al sujeto junto con un segundo agente terapéutico.

RESUMEN

La presente descripción proporciona proteínas de unión al antígeno que se unen específicamente a un péptido del carcinoma de células escamosas esofágico 1 de Nueva York (NY-ESO-1) presente en HLA y métodos terapéuticos y de diagnóstico para el uso de estas proteínas de unión. Las proteínas de unión al antígeno de la presente descripción se unen con un alto grado de especificidad a los péptidos del NY-ESO-1 presentes en HLA y no se unen a los péptidos presentes en HLA que difieren en 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos.