

PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS MAGEA1, PROTEÍNAS DE UNIÓN QUE RECONOCEN PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS MAGEA1, Y USOS DE ESTOS

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 63/342,415 presentada el 16 de mayo de 2022; la solicitud provisional estadounidense n.º 63/317,337 presentada el 7 de marzo de 2022, y la solicitud provisional estadounidense n.º 63/277,924, presentada el 10 de noviembre de 2021, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

10

Antecedentes de la invención

- La transferencia celular adoptiva (ACT, por sus siglas en inglés) que utiliza células T modificadas genéticamente ha demostrado gran eficacia en el tratamiento de determinados tipos de tumores líquidos y es prometedora para el tratamiento de tumores sólidos. Las células
- 15 T modificadas genéticamente por el receptor de células T (TCR-T) son células T que expresan un TCR exógeno que reconoce un antígeno que existe en células cancerosas. La interacción TCR-antígeno es el componente principal del mecanismo de direccionamiento que permite que TCR-células T eliminen las células cancerosas. Uno de los desafíos para el análisis amplio y la adopción de la terapia de TCR-T es la falta de pares de TCR-antígeno que puedan aplicarse
- 20 a una gran variedad de pacientes e indicaciones. Si bien en ensayos clínicos se han investigado varios TCR y antígenos, la mayoría de los antígenos analizados están limitados a un alelo HLA, a saber, HLA-A*02:01, lo que limita la cantidad de pacientes que pueden seleccionarse para la terapia y, además, permite que las células cancerosas desarrollen una posible resistencia al mutar el alelo HLA-A*02:01.
- 25 Además, la cantidad de antígenos analizados es limitada debido a la dificultad para descubrir pares de TCR-antígeno novedosos que comúnmente requieren la predicción del epítipo presentado por MHC. Sin embargo, dichos epítopos pueden no ser inmunogénicos, lo que dificulta la identificación de un TCR reactivo, o puede que las células cancerosas no procesen y presenten fisiológicamente el epítipo. Por consiguiente, existe una gran necesidad en la
- 30 técnica de identificar pares de TCR-antígeno en el contexto de una variedad de alelos HLA ampliamente aplicables para desarrollar reactivos útiles para diagnosticar, pronosticar, tratar y

analizar agentes pertinentes para trastornos caracterizados por la expresión de los antígenos.

Compendio de la invención

La presente invención se basa, al menos parcialmente, en el descubrimiento de péptidos
5 inmunogénicos MAGEA1 y proteínas de unión que reconocen dichos péptidos inmunogénicos
MAGEA1 basados en análisis funcionales no sesgados usados para descubrir el antígeno de
clonotipos de TCR identificados a partir de sujetos con trastornos asociados con la expresión
de MAGEA1 (por ejemplo, sujetos que padecen melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer
10 de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer
gastrointestinal, carcinoma invasivo de mama o carcinoma urotelial de vejiga). Los TCR
identificados reconocen péptidos inmunogénicos MAGEA1, como los enumerados en la Tabla
1, en el contexto de una variedad de alelos HLA (por ejemplo, HLA-C*07:02). En la presente
se demuestra que MAGEA1 se expresa de manera selectiva en tejido canceroso y de
15 testículos, pero no en tejidos somáticos normales, lo que lo convierte en una diana ideal para
ACT. La capacidad de las proteínas de unión a MAGEA1 (por ejemplo, TCR descritos en la
presente) de unirse a péptidos inmunogénicos MAGEA1 y de provocar respuestas inmunitarias
que destruyan células que expresan MAGEA1 (por ejemplo, células cancerosas) demuestra la
utilidad de dichas proteínas de unión en una diversidad de usos, que incluyen métodos de
20 diagnóstico, pronóstico, tratamiento y análisis de agentes pertinentes para trastornos
caracterizados por la expresión de MAGEA1.

En un aspecto, se proporciona un péptido inmunogénico que comprende un epítipo peptídico
seleccionado de secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1.

En otro aspecto, se proporciona un péptido inmunogénico que consiste en un epítipo peptídico
seleccionado de secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1.

25 Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto
comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita
en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, el péptido inmunogénico deriva de una proteína
MAGEA1, opcionalmente donde el péptido inmunogénico tiene una longitud de 8, 9, 10, 11,
12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos. En otra modalidad, el
30 péptido inmunogénico es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra MAGEA1 y/o
células que expresan MAGEA1 en un sujeto, opcionalmente donde la respuesta inmunitaria i)

es una respuesta de célula T y/o una respuesta de célula T CD8+ y/o ii) se selecciona del grupo que consiste en la expansión de células T (por ejemplo, proliferación), liberación de citocinas y/o destrucción citotóxica.

En aun otro aspecto, se proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos un péptido inmunogénico descrito en la presente.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, la composición inmunogénica comprende, además, un adyuvante. En otra modalidad, la composición inmunogénica es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra MAGEA1 y/o células que expresan MAGEA1 en un sujeto, opcionalmente donde la respuesta inmunitaria i) es una respuesta de célula T y/o una respuesta de célula T CD8+ y/o ii) se selecciona del grupo que consiste en la expansión de células T (por ejemplo, proliferación), liberación de citocinas y/o destrucción citotóxica.

En aun otro aspecto, se proporciona una composición que comprende un epítipo peptídico que se selecciona de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1, y una molécula MHC.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, la molécula MHC es un multímero MHC, opcionalmente donde el multímero MHC es un tetrámero. En otra modalidad, la molécula MHC es una molécula MHC de clase I. En aun otra modalidad, la molécula MHC comprende una cadena alfa MHC que es un serotipo HLA seleccionado del grupo que consiste en HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*01, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-C*07, HLA-C*01, HLA-C*02, HLA-C*03, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14, HLA-C*15, HLA-C*16, HLA-C*17 y HLA-C*18, opcionalmente donde el alelo HLA se selecciona del grupo que consiste en HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0212, HLA-A*0213, HLA-A*0214, HLA-A*0216, HLA-A*0217, HLA-A*0219, HLA-A*0220, HLA-A*0222, HLA-A*0224, HLA-A*0230, HLA-A*0242, HLA-A*0253, HLA-A*0260, alelo HLA-A*0274, HLA-A*0301, HLA-A*0302, HLA-A*0305, HLA-A*0307, HLA-A*0101, HLA-A*0102, HLA-A*0103, alelo HLA-A*0116, HLA-A*1101, HLA-A*1102, HLA-A*1103, HLA-A*1104, HLA-A*1105, alelo HLA-

A*1119, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2405, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2410, HLA-A*2414, HLA-A*2417, HLA-A*2420, HLA-A*2422, HLA-A*2425, HLA-A*2426, alelo HLA-A*2458, HLA-B*0702, HLA-B*0704, HLA-B*0705, HLA-B*0709, HLA-B*0710, HLA-B*0715, HLA-B*0721, HLA-C*0702, HLA-C*0701 , HLA-C*0401, HLA-C*0602, HLA-C*0304, HLA-C*0501, HLA-C*1601, HLA-C*0202, HLA-C*0303, HLA-C*1203, HLA-C*0802, HLA-C*0102, HLA-C*1701, HLA-C*1502, HLA-C*1402, HLA-C*1202, HLA-C*0704, HLA-C*0801, HLA-C*0302, HLA-C*1801, HLA-C*1505, HLA-C*1602, HLA-C*0804, HLA-C*0305 y alelo HLA-C*1403.

En otro aspecto, se proporciona un complejo de MHC-péptido estable, que comprende un péptido inmunogénico descrito en la presente en el contexto de una molécula MHC.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, la molécula MHC es un multímero MHC, opcionalmente donde el multímero MHC es un tetrámero. En otra modalidad, la molécula MHC

es una molécula MHC de clase I. En aun otra modalidad, la molécula MHC comprende una cadena alfa MHC que es un serotipo HLA seleccionado del grupo que consiste en HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*01, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-C*07, HLA-C*01, HLA-C*02, HLA-C*03, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14, HLA-C*15, HLA-C*16, HLA-C*17 y HLA-C*18, opcionalmente donde el alelo HLA se selecciona del grupo

que consiste en HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0212, HLA-A*0213, HLA-A*0214, HLA-A*0216, HLA-A*0217, HLA-A*0219, HLA-A*0220, HLA-A*0222, HLA-A*0224, HLA-A*0230, HLA-A*0242, HLA-A*0253, HLA-A*0260, alelo HLA-A*0274, HLA-A*0301, HLA-A*0302, HLA-A*0305, HLA-A*0307, HLA-A*0101, HLA-A*0102, HLA-A*0103, alelo HLA-A*0116, HLA-A*1101, HLA-A*1102, HLA-A*1103, HLA-A*1104, HLA-A*1105, alelo HLA-A*1119, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2405, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2410, HLA-A*2414, HLA-A*2417, HLA-A*2420, HLA-A*2422, HLA-A*2425, HLA-A*2426, alelo HLA-A*2458, HLA-B*0702, HLA-B*0704, HLA-B*0705, HLA-B*0709, HLA-B*0710, HLA-B*0715, HLA-B*0721, HLA-C*0702, HLA-C*0701 , HLA-C*0401, HLA-C*0602, HLA-C*0304, HLA-C*0501, HLA-C*1601, HLA-C*0202, HLA-C*0303, HLA-C*1203, HLA-C*0802, HLA-C*0102, HLA-C*1701, HLA-C*1502, HLA-C*1402, HLA-C*1202, HLA-C*0704, HLA-C*0801, HLA-

C*0302, HLA-C*1801, HLA-C*1505, HLA-C*1602, HLA-C*0804, HLA-C*0305 y alelo HLA-C*1403. En aun otra modalidad, el epítipo peptídico y la molécula MHC se unen covalentemente y/o donde las cadenas alfa y beta de la molécula MHC se unen covalentemente. En otra modalidad, el complejo MHC-péptido estable comprende una etiqueta detectable, opcionalmente donde la etiqueta detectable es un fluoróforo.

En aun otro aspecto, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un complejo de MHC-péptido estable descrito en la presente, y un adyuvante.

En aun otro aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un péptido inmunogénico descrito en la presente, o un complemento de este.

10 En otro aspecto, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado descrito en la presente.

En aun otro aspecto, se proporciona una célula que a) comprende un ácido nucleico aislado descrito en la presente, b) comprende un vector descrito en la presente, y/o c) produce uno o más péptidos inmunogénicos descritos en la presente y/o presenta en la superficie celular uno o más complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente, opcionalmente donde la célula se modifica genéticamente.

15 En aun otro aspecto, se proporciona un dispositivo o kit que comprende a) uno o más péptidos inmunogénicos descritos en la presente y/o b) uno o más complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente, donde dicho dispositivo o kit comprende opcionalmente un reactivo para detectar la unión de a) y/o b) a una proteína de unión, opcionalmente donde la proteína de unión es un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión al antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígenos quiméricos (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector.

20 En otro aspecto, se proporciona un método para detectar células T que se unen a un complejo de MHC-péptido estable que comprende: a) poner en contacto una muestra que comprende células T con un complejo de MHC-péptido estable descrito en la presente; y b) detectar la unión de células T al complejo de MHC-péptido estable, y además determinar opcionalmente el porcentaje de células T específicas de MHC-péptido estable que se unen al complejo de MHC-péptido estable, opcionalmente donde la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, las células T son células T CD8+. En otra modalidad, la detección y/o determinación se realiza usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoquímicamente, transferencia Western o ensayo de flujo intracelular. En aun otra modalidad, una muestra comprende células T que entran en contacto con, o se sospecha que entraron en contacto con, una o más proteínas MAGEA1 o fragmentos de estas.

- 5 En aun otro aspecto, se proporciona un método para determinar si una célula T ha estado expuesta a MAGEA1, que comprende: a) incubar una población celular que comprende células T con un péptido inmunogénico descrito en la presente o un complejo de MHC-péptido estable descrito en la presente; y b) detectar la presencia o el nivel de reactividad, donde la presencia o un nivel más alto de reactividad en comparación con un nivel de control indica que la célula
- 10 T ha estado expuesta a MAGEA1, opcionalmente donde la población celular que comprende células T se obtiene de un sujeto.

- En aun otro aspecto, se proporciona un método para predecir el resultado clínico de un sujeto que padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 que comprende: a) determinar la presencia o nivel de reactividad entre células T obtenidas del sujeto y uno o más péptidos inmunogénicos descritos en la presente o uno o más complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente, y b) comparar la presencia o el nivel de reactividad con el de un control, donde el control se obtiene de un sujeto que presenta un buen resultado clínico; donde la presencia o un nivel más alto de reactividad en la muestra del sujeto, en comparación con el control, indica que el sujeto presenta un buen resultado clínico.
- 20

- 25 En otro aspecto, se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 que comprende: a) determinar la presencia o el nivel de reactividad entre las células T obtenidas del sujeto y uno o más péptidos inmunogénicos descritos en la presente o uno o más complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente, en una primera muestra obtenida del sujeto antes de proporcionar al
- 30 menos una parte de la terapia al sujeto, y b) determinar la presencia o el nivel de reactividad entre uno o más péptidos inmunogénicos descritos en la presente, uno o más complejos de

MHC-péptido estables descritos en la presente y células T obtenidas del sujeto presentes en una segunda muestra obtenida del sujeto luego de la administración de la terapia al sujeto, donde la presencia o un nivel más alto de reactividad en la segunda muestra, con respecto a la primera muestra, es una indicación de que la terapia es eficaz para el tratamiento del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, el nivel de reactividad está indicado por a) la presencia de unión y/o b) la activación de células T y/o función efectora, opcionalmente donde la activación de células T o función efectora es la proliferación y destrucción de células T o la liberación de citocinas. En otra modalidad, un método comprende, además, repetir las etapas a) y b) en un punto temporal posterior, opcionalmente donde el sujeto se ha sometido al tratamiento para mejorar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 entre el primer punto temporal y el punto temporal posterior. En aun otra modalidad, la unión a las células T, la activación y/o la función efectora es detectada usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoquímicamente, transferencia Western o ensayo de flujo intracelular. En aun otra modalidad, un nivel de control es un número de referencia. En otra modalidad, un nivel de control es un nivel de un sujeto sin el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

En aun otro aspecto, un método para prevenir y/o tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en la presente.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para identificar una molécula de unión a péptidos, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que se une a un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1 que comprende: a) proporcionar una célula que presenta un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1 en el contexto de una molécula MHC en la superficie de la célula; b) determinar la unión de varias moléculas de unión a péptidos posibles o fragmentos de unión al antígeno de estas al epítipo peptídico en el contexto de la molécula MHC en la célula; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptidos o fragmentos de unión al

antígeno de estas que se unen al epítipo peptídico en el contexto de la molécula MHC.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, una etapa a) comprende poner en contacto la
 5 molécula MHC en la superficie de la célula con un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1. En otra modalidad, una etapa a) comprende expresar el epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1 en la célula usando un vector que comprende una secuencia heteróloga que codifica el epítipo peptídico.

10 En otro aspecto, se proporciona un método para identificar una molécula de unión a péptidos, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que se une a un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1 que comprende: a) proporcionar un epítipo peptídico ya sea solo o en un complejo de MHC-péptido estable, que comprende un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1, ya
 15 sea solo o en el contexto de una molécula MHC; b) determinar la unión de varias moléculas de unión a péptidos posibles o fragmentos de unión al antígeno de estas al péptido o complejo de MHC-péptido estable; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptidos o fragmentos de unión al antígeno de estas que se unen al epítipo peptídico o el complejo de MHC-péptido estable, opcionalmente donde el MHC o complejo de MHC-péptido es como se describe en la
 20 presente.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, diversas moléculas de unión a péptidos posibles comprenden un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un
 25 TCR, un fragmento de unión al antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígenos quiméricos (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector. En otra modalidad, diversas moléculas de unión a péptidos posibles comprenden al menos 2, 5, 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o más moléculas de unión a péptidos posibles diferentes. En aun otra modalidad, diversas moléculas de unión a péptidos
 30 posibles comprenden una o más moléculas de unión a péptidos posibles que se obtienen de una muestra de un sujeto o una población de sujetos; o las diversas moléculas de unión a

péptidos posibles comprenden una o más moléculas de unión a péptidos posibles que comprenden mutaciones en una molécula de unión a péptidos de estructura original obtenida de una muestra de un sujeto. En aun otra modalidad, un sujeto o población de sujetos a) no padecen un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o no se han recuperado de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, o b) padecen un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En otra modalidad, a un sujeto o a una población de sujetos se le ha administrado una composición descrita en la presente. En aun otra modalidad, un sujeto es un modelo animal de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o un mamífero, opcionalmente donde el mamífero es un ser humano, un primate o un roedor. En aun otra modalidad, un sujeto es un modelo animal de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, un ratón transgénico HLA y/o un ratón transgénico TCR humano. En otra modalidad, una muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T y/o células T CD8+ de memoria.

En aun otro aspecto, se proporciona una molécula de unión a péptidos o fragmento de unión al antígeno de esta que se identifica de acuerdo con un método descrito en la presente, opcionalmente donde la molécula de unión a péptidos o fragmento de unión al antígeno de esta es un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión al antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígenos quiméricos (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células T modificadas genéticamente que expresan una molécula de unión a péptidos o fragmento de unión al antígeno de esta que i) se une a un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias enumeradas en la Tabla 1, ii) se identifica de acuerdo con un método descrito en la presente, y/o iii) se une a un complejo de MHC-péptido estable que comprende epítopos peptídicos seleccionados de las secuencias enumeradas en la Tabla 1 en el contexto de una molécula MHC, opcionalmente donde la molécula de unión a péptidos o fragmento de unión al antígeno de esta es un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión al antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígenos quiméricos (CAR), o una proteína de fusión que

comprende un TCR y un dominio efector, opcionalmente donde el MHC o complejo de MHC-péptido es como se describe en la presente.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, las células T se aíslan de a) el sujeto, b) un donante que no padece el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, o c) un donante recuperado de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto que comprende transfundir células T específicas del antígeno al sujeto, donde las células T específicas del antígeno se generan: a) estimulando células inmunitarias de un sujeto con una composición descrita en la presente; y b) expandiendo células T específicas del antígeno *in vitro* o *ex vivo*, opcionalmente i) aislando células inmunitarias del sujeto antes de estimular las células inmunitarias y/o ii) donde las células inmunitarias comprenden PBMC, células T, células T CD8+, células T sin tratamiento previo, células T de memoria central y/o células T de memoria efectoras.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, los agentes se ponen en contacto en condiciones y durante un tiempo adecuado para la formación de al menos un complejo inmunitario entre el epítipo peptídico, péptido inmunogénico, complejo de MHC-péptido estable, receptor de células T y/o células inmunitarias. En otra modalidad, el epítipo peptídico, péptido inmunogénico, complejo de MHC-péptido estable y/o receptor de células T es expresado por las células y las células se expanden y/o aíslan durante una o más etapas. En aun otra modalidad, un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es un cáncer o recaída de este, opcionalmente donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma invasivo de mama y carcinoma urotelial de vejiga. En aun otra modalidad, un sujeto es un modelo animal de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o un mamífero, opcionalmente donde el mamífero es un ser humano, un primate o un roedor.

En aun otro aspecto, se proporciona una proteína de unión que se une a un polipéptido que

comprende una secuencia peptídica inmunogénica descrita en la presente, un péptido inmunogénico descrito en la presente y/o el complejo de MHC-péptido estable descrito en la presente, opcionalmente donde la proteína de unión es un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión al antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígenos quiméricos (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, se proporciona una proteína de unión

comprende: a) una secuencia de CDR de cadena alfa del receptor de células T (TCR) con al menos alrededor de 80 % de identidad con una secuencia de CDR de cadena alfa del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de CDR de cadena alfa del TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de CDR de cadena beta del TCR con al menos

alrededor de 80 % de identidad con una secuencia de CDR de cadena beta del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de CDR de cadena beta del TCR enumeradas en la Tabla 2, donde la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente donde la afinidad de unión tiene una K_d inferior o igual a alrededor de 5×10^{-4} M. En otra modalidad, una proteína de unión

comprende: a) una secuencia de dominio variable (V_α) de cadena alfa del TCR con al menos alrededor de 80% de identidad con una secuencia de dominio V_α del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_α del TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de dominio variable (V_β) de cadena beta del TCR con al menos alrededor

de 80% de identidad con una secuencia de dominio V_β del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_β del TCR enumeradas en la Tabla 2, donde la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente donde la afinidad de unión tiene una K_d inferior o igual a alrededor de

5×10^{-4} M. En aun otra modalidad, una proteína de unión comprende: a) una secuencia de cadena alfa del TCR con al menos alrededor de 80% de identidad con una secuencia de cadena alfa del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de cadena alfa del TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de cadena beta del TCR con al menos alrededor de 80% de identidad con una secuencia de cadena beta del TCR que se

selecciona del grupo que consiste en las secuencias de cadena beta del TCR enumeradas en la Tabla 2, donde la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente donde la afinidad de unión tiene una K_d inferior o igual a alrededor de 5×10^{-4} M. En aun otra modalidad, una proteína de unión comprende: a) una secuencia de CDR de cadena alfa del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencia de CDR de cadena alfa del TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de CDR de cadena beta del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencia de CDR de cadena beta del TCR enumeradas en la Tabla 2, donde la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente donde la afinidad de unión tiene una K_d inferior o igual a alrededor de 5×10^{-4} M. En aun otra modalidad, una proteína de unión comprende: a) una secuencia de dominio variable (V_α) de cadena alfa del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_α del TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de dominio variable (V_β) de cadena beta del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_β del TCR enumeradas en la Tabla 2, donde la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente donde la afinidad de unión tiene una K_d inferior o igual a alrededor de 5×10^{-4} M. En otra modalidad, se proporciona una proteína de unión comprende: a) una secuencia de cadena alfa de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de cadena alfa de TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de cadena beta de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de cadena beta de TCR enumeradas en la Tabla 2, donde la proteína de unión es capaz de unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente donde la afinidad de unión tiene una K_d inferior o igual a alrededor de 5×10^{-4} M. En otra modalidad, 1) una CDR de cadena alfa del TCR, dominio V_α del TCR, y/o cadena alfa del TCR se encuentran codificados por un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC o un fragmento de estos, que se seleccionan del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC enumerados en la Tabla 2, y/o 2) una CDR de cadena beta del TCR, un dominio V_β del TCR y/o cadena beta del TCR se encuentran codificados por un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC o un fragmento de estos, que se seleccionan del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC enumerados en la Tabla 2, y/o 3) cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, eliminaciones de aminoácidos, o una combinación de estas en comparación con

la secuencia de CDR de referencia afín enumerada en la Tabla 2. En aun otra modalidad, una proteína de unión es quimérica, humanizada o humana. En aun otra modalidad, una proteína de unión comprende un dominio de unión que tiene un dominio transmembrana y un dominio efector que es intracelular. En otra modalidad, una cadena alfa del TCR y una cadena beta del TCR se unen covalentemente, opcionalmente donde la cadena alfa del TCR y la cadena beta del TCR se unen covalentemente a través a un péptido enlazador. En aun otra modalidad, una cadena alfa del TCR y/o una cadena beta del TCR se unen covalentemente a un resto, opcionalmente donde el resto unido covalentemente comprende una etiqueta de afinidad. En aun otra modalidad, una etiqueta de afinidad se selecciona del grupo que consiste en una etiqueta de enriquecimiento aCD34, glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a calmodulina (CBP), etiqueta de proteína C, etiqueta Myc, HaloTag, etiqueta HA, etiqueta Flag, etiqueta His, etiqueta biotina y etiqueta V5, y/o donde la etiqueta es una proteína fluorescente. En otra modalidad, un resto unido covalentemente se selecciona del grupo que consiste en un agente inflamatorio, citocina, toxina, molécula citotóxica, isótopo radioactivo o anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En aun otra modalidad, una proteína de unión se une al complejo pMHC en una superficie celular. En aun otra modalidad, un MHC o complejo MHC-péptido es como se describe en la presente. En otra modalidad, la unión de una proteína de unión al complejo de péptido MAGEA1-MHC (pMHC) provoca una respuesta inmunitaria, opcionalmente donde la respuesta inmunitaria i) es una respuesta de célula T y/o una respuesta de célula T CD8+ y/o ii) se selecciona del grupo que consiste en la expansión de células T, liberación de citocinas y/o destrucción citotóxica. En aun otra modalidad, una proteína de unión es capaz de unirse específica y/o selectivamente a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC) con una K_d inferior o igual a alrededor de 1×10^{-4} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-5} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-5} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-6} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-6} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-7} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-7} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-8} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-8} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-9} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-9} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-10} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-10} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-11} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-11} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-12} M o inferior o igual a alrededor de 1×10^{-12} M. En aun otra modalidad, una proteína de unión tiene una afinidad de unión superior al péptido-MHC

(pMHC) que un receptor de células T conocido, opcionalmente donde la afinidad de unión superior es al menos alrededor de 1,05 veces superior. En otra modalidad, una proteína de unión induce una mayor expansión de células T, liberación de citocinas y/o destrucción citotóxica que un receptor de células T conocido cuando entra en contacto con células diana con una expresión heterocigota de MAGEA1, opcionalmente donde la inducción es al menos 1,05 veces superior. Como se usa en la presente, las referencias a cambios múltiples, en algunas modalidades, pueden ser en comparación con cualquier modalidad de referencia de interés, como la comparación con una proteína de unión diferente; la comparación con la misma proteína de unión en un contexto diferente como la expresión de la misma proteína de unión en una célula inmunitaria diferente, a un nivel diferente, en combinación con otros agentes descritos en la presente; y similares. En aun otra modalidad, la destrucción citotóxica es de una célula cancerosa diana. En aun otra modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma invasivo de mama y carcinoma urotelial de vejiga. En otra modalidad, una proteína de unión no se une a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítipo peptídico LAMB4-IR, TLE3, SLC16A2, SLC6A13, BTBD2, RXFP1 y/o PIGO. Estos genes son conocidos y reconocidos en la técnica para registrarse de acuerdo con los siguientes números ID de genes NCBI, cada uno de los cuales está disponible en la web en ncbi.nlm.nih.gov/gene: TLE3: ID de gen 7090 y NM_005078.4 NP_005069.2 como clones representativos; SLC16A2: ID de gen 6567 y NM_006517.5 y NP_006508.2 como clones representativos; SLC6A13: ID de gen 6540 y NM_016615.5 y NP_057699.2 como clones representativos; BTBD2: ID de gen 55643 y NM_017797.4 y NP_060267.2 como clones representativos; RXFP1: ID de gen 59350 y NM_021634.4 y NP_067647.2 como clones representativos; y PIGO: ID de gen 84720 y NM_032634.4 y NP_116023.2 como clones representativos. LAMB4-IR es una transcripción con predicción bioinformática que aún debe identificarse en células y cuyas secuencias de codificación (CDS) y de proteínas se proporcionan en la Tabla 3 a continuación. LAMB4-IR tiene una ubicación cromosómica de chr7: 108043489-108123164 según se menciona de acuerdo con el ensamblaje de Genome Reference Consortium Human GRCh38.p13 (GCA_000001405.28) (UCSC HG38) (registro disponible en la web en ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000001405.28/).

En aun otro aspecto, se proporciona una cadena alfa y/o cadena beta del TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de cadena alfa y cadena beta del TCR enumeradas en la Tabla 2.

5 En otro aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada i) que se hibrida, en condiciones rigurosas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias polipeptídicas enumeradas en la Tabla 2, ii) una secuencia con al menos alrededor de 80% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias polipeptídicas enumeradas en la Tabla 2, y/o iii) ii) una secuencia con al menos alrededor de
10 80% de homología con un ácido nucleico que codifica enumerado en la Tabla 2, opcionalmente donde la molécula de ácido nucleico aislada comprende 1) un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC o un fragmento de este que se selecciona del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC enumerados en la Tabla 2 y/o 2) un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC o fragmento de este que se selecciona del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC enumerados en la Tabla 2.

15 Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, un ácido nucleico se optimiza con codones para la expresión en una célula hospedadora.

En aun otro aspecto, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado
20 descrito en la presente, opcionalmente donde i) el vector es un vector de clonación, vector de expresión o vector viral y/o ii) el vector comprende una secuencia de vectores enumerada en la Tabla 3.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita
25 en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, un vector comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD8 α CD8 β , un receptor de TGF β negativo dominante II (DN-TGF β RII), marcador de proteína seleccionable, opcionalmente donde el marcador de proteína seleccionable es dihidrofolato reductasa (DHFR). En otra modalidad, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteína seleccionable
30 está unido de manera operativa a un ácido nucleico que codifica una etiqueta. En aun otra modalidad, un ácido nucleico que codifica una etiqueta se encuentra 5' corriente arriba de la

secuencia de ácido nucleico que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII, y/o la proteína seleccionable de manera que la etiqueta se fusione con el extremo N de CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteína seleccionable. En aun otra modalidad, una etiqueta es una etiqueta de enriquecimiento CD34. En otra modalidad, un ácido nucleico aislado descrito en la presente, ya sea solo o combinado con una secuencia de ácido nucleico que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII y/o el marcador de proteína seleccionable se interconectan con un sitio interno de entrada al ribosoma o una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido autoescindible. En aun otra modalidad, un péptido autoescindible es P2A, E2A, F2A o T2A.

- 10 En aun otro aspecto, se proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado descrito en la presente comprende un vector descrito en la presente, y/o expresa una proteína de unión descrita en la presente, opcionalmente donde la célula está modificada genéticamente.

- Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, una célula hospedadora comprende una inactivación de un gen cromosómico de un gen TCR, un gen HLA, o ambos. En otra modalidad, una célula hospedadora comprende una inactivación de un gen HLA seleccionado de un gen de macroglobulina α 1, gen de macroglobulina α 2, gen de macroglobulina α 3, gen de microglobulina β 1, gen de microglobulina β 2, y combinaciones de estos. En aun otra modalidad, una célula hospedadora comprende una inactivación de un gen de TCR que se selecciona de un gen de la región variable de TCR α , gen de la región variable de TCR β , gen de la región constante de TCR, y combinaciones de estos. En aun otra modalidad, una célula hospedadora expresa CD8 α , CD8 β , a DN-TGF β RII, y/o un marcador de proteína seleccionable, opcionalmente donde el marcador de proteína seleccionable es DHFR, y además opcionalmente donde el CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β RII, y/o el marcador de proteína seleccionable se fusiona con una etiqueta de enriquecimiento CD34. En otra modalidad, las células hospedadoras están enriquecidas usando la etiqueta de enriquecimiento CD34. En aun otra modalidad, una célula hospedadora es una célula progenitora hematopoyética, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula de sangre del cordón umbilical o una célula inmunitaria. En aun otra modalidad, una célula inmunitaria es una célula T, linfocito

citotóxico, célula precursora de linfocitos citotóxicos, célula progenitora de linfocitos citotóxicos, célula madre de linfocitos citotóxicos, célula T CD4⁺, célula T CD8⁺, célula T doble negativa CD4/CD8, célula T gamma delta ($\gamma\delta$), linfocitos citolíticos (NK), célula NK-T, célula dendrítica, o una combinación de estas. En aun otra modalidad, una célula T es una célula T virgen, una

5 célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o una combinación de estas. En otra modalidad, una célula T es una célula T primaria o una línea de célula T. En aun otra modalidad, una célula T no expresa o tiene una menor expresión en la superficie de un TCR endógeno. En aun otra modalidad, una célula hospedadora es capaz de producir una citocina o una molécula citotóxica cuando entra en contacto con una célula diana que comprende un

10 complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítipo peptídico MAGEA1 en el contexto de una molécula MHC. En otra modalidad, una célula hospedadora entra en contacto con la célula diana *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. En aun otra modalidad, una citocina es TNF- α , IL-2 y/o IFN- γ . En aun otra modalidad, una molécula citotóxica es perforinas y/o granzimas, opcionalmente donde la molécula citotóxica es granzima B. En otra modalidad, una célula

15 hospedadora es capaz de producir un nivel superior de citocina o una molécula citotóxica cuando entra en contacto con una célula diana con una expresión heterocigota de MAGEA1. En aun otra modalidad, una célula hospedadora es capaz de producir al menos 1,05 veces más nivel de citocina o una molécula citotóxica. En aun otra modalidad, una célula hospedadora es capaz de destruir una célula diana que comprende un complejo de péptido-

20 MHC (pMHC) que comprende el epítipo peptídico MAGEA1 en el contexto de una molécula MHC. En otra modalidad, la destrucción se determina mediante un ensayo de destrucción. En aun otra modalidad, una relación de la célula hospedadora y la célula diana en el ensayo de destrucción es de 20:1 a 1:4. En aun otra modalidad, una célula diana es una célula diana pulsada con 1 μ g/mL a 50 pg/mL de péptido MAGEA1, opcionalmente donde la célula diana

25 es una célula monoalélica para un MHC que se corresponde con el péptido MAGEA1. En otra modalidad, una célula hospedadora es capaz de destruir una cantidad mayor de células diana cuando entra en contacto con células diana con una expresión heterocigota de MAGEA1, opcionalmente donde la destrucción celular es al menos 1,05 veces superior. En una otra modalidad, una célula diana es una línea celular o una célula primaria, opcionalmente donde

30 la célula diana se selecciona del grupo que consiste en una línea celular derivada de HEK293, una línea celular de cáncer, una célula cancerosa primaria, una línea celular transformada y

una línea celular immortalizada. En aun otra modalidad, un péptido inmunogénico MAGEA1 es como se describe en la presente y/o donde un complejo de MHC o MHC-péptido es como se describe en la presente. En otra modalidad, una célula hospedadora no induce la expansión de células T, liberación de citocinas o destrucción citotóxica cuando entra en contacto con una

5 célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítipo peptídico LAMB4-IR, TLE3, SLC16A2, SLC6A13, BTBD2, RXFP1 y/o PIGO. En aun otra modalidad, una célula hospedadora no expresa el antígeno MAGEA1, no es reconocida por una proteína de unión descrita en la presente, no es de serotipo HLA-C*07 y/o no expresa un alelo HLA-C*07.

10 En otro aspecto, se proporciona una población de células hospedadoras descritas en la presente.

En aun otro aspecto, se proporciona una composición que comprende a) una proteína de unión descrita en la presente, b) un ácido nucleico aislado descrito en la presente, c) un vector descrito en la presente, d) una célula hospedadora descrita en la presente y/o e) una población

15 de células hospedadoras descritas en la presente y un portador.

En otro aspecto más, se proporciona un dispositivo o kit que comprende a) una proteína de unión descrita en la presente, b) un ácido nucleico aislado descrito en la presente, c) un vector descrito en la presente, d) una célula hospedadora descrita en la presente y/o e) una población de células hospedadoras descritas en la presente, donde dicho dispositivo o kit comprende

20 opcionalmente un reactivo para detectar la unión de a), d) y/o e) a un complejo de pMHC.

En otro aspecto, se proporciona un método para producir una proteína de unión descrita en la presente, donde el método comprende las etapas de: (i) cultivar una célula hospedadora transformada que ha sido transformada por un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente en condiciones adecuadas para

25 permitir la expresión de dicha proteína de unión; y (ii) recuperar la proteína de unión expresada.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para producir una célula hospedadora que expresa una proteína de unión descrita en la presente, donde el método comprende las etapas de: (i) introducir un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente en la célula hospedadora; (ii) cultivar la célula hospedadora

30 transformada en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un

antígeno MAGEA1 y/o una célula que expresa MAGEA1, opcionalmente donde la célula es una célula hiperproliferativa, que comprende detectar la presencia o ausencia de dicho antígeno MAGEA1 en una muestra mediante el uso de al menos una proteína de unión descrita en la presente, al menos una célula hospedadora descrita en la presente, o una población de células hospedadoras descrita en la presente, donde la detección del antígeno MAGEA1 es indicativa de la presencia de un antígeno MAGEA1 y/o célula que expresa MAGEA1.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, al menos una proteína de unión, o al menos una célula hospedadora, forma un complejo con el péptido MAGEA1 en el contexto de una molécula MHC, y el complejo se detecta en forma de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoquímicamente, transferencia Western o ensayo de flujo intracelular. En otra modalidad, un método comprende además obtener una muestra de un sujeto.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar el nivel de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto, que comprende: a) poner en contacto una muestra obtenida del sujeto con al menos una proteína de unión descrita en la presente, al menos una célula hospedadora descrita en la presente o una población de células hospedadoras descrita en la presente; y b) detectar el nivel de reactividad, donde la presencia o un mayor nivel de reactividad en comparación con un nivel de control indica el nivel del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, un nivel de control es un número de referencia. En otra modalidad, un nivel de control es un nivel de un sujeto sin el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para controlar la evolución de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto, donde el método comprende: a) detectar en una muestra del sujeto la presencia o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y al menos una proteína de unión descrita en la presente, al menos una

célula hospedadora descrita en la presente, o una población de células hospedadoras descritas en la presente; b) repetir la etapa a) en un punto en el tiempo posterior; y c) comparar el nivel de MAGEA1 o la célula de interés que expresa MAGEA1 detectado en las etapas a) y b) para controlar la evolución del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto, donde un nivel ausente o reducido de MAGEA1 o la célula de interés que expresa MAGEA1 detectado en la etapa b) en comparación con la etapa a) indica una evolución inhibida del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto y una presencia o nivel más alto de MAGEA1 o la célula de interés que expresa MAGEA1 detectado en la etapa b) en comparación con la etapa a) indica la evolución del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, un sujeto se ha sometido a tratamiento para tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 entre el primer punto en el tiempo y el punto posterior en el tiempo.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para predecir el resultado clínico de un sujeto que padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 que comprende: a) determinar la presencia o nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y al menos una proteína de unión descrita en la presente, al menos una célula hospedadora descrita en la presente, o una población de células hospedadoras descrita en la presente, y b) comparar la presencia o el nivel de reactividad con el de un control, donde el control se obtiene de un sujeto que presenta un buen resultado clínico; donde la ausencia o un nivel reducido de reactividad en la muestra del sujeto, en comparación con el control, indica que el sujeto presenta un buen resultado clínico.

En otro aspecto, se proporciona un método para evaluar la eficacia de una terapia para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 que comprende: a) determinar la presencia o nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y al menos una proteína de unión descrita en la presente, al menos una célula hospedadora descrita en la presente, o una población de células hospedadoras descrita en la presente, en una primera muestra obtenida del sujeto antes de proporcionar al menos una porción de la terapia para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 al sujeto, y b) determinar la presencia o el nivel de

reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y al menos una proteína de unión descrita en la presente, al menos una célula hospedadora descrita en la presente, o una población de células hospedadoras descrita en la presente, en una segunda muestra obtenida del sujeto después de la provisión de la terapia para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, donde la ausencia o un nivel reducido de reactividad en la segunda muestra, con respecto a la primera muestra, es una indicación de que la terapia es eficaz para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto, y donde la presencia o un nivel mayor de reactividad en la segunda muestra, con respecto a la primera muestra, es una indicación de que la terapia no es eficaz para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, un nivel de reactividad se indica mediante a) la presencia de unión y/o b) activación de células T y/o función efectora, opcionalmente donde la activación de células T o función efectora es proliferación de células T, aniquilación o liberación de citocinas. En otra modalidad, la unión a las células T, la activación y/o la función efectora es detectada usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), inmunoquímicamente, transferencia Western o ensayo de flujo intracelular.

En aun otro aspecto, se proporciona un método para prevenir y/o tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 que comprende poner en contacto las células diana que expresan MAGEA1 con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células que expresan al menos una proteína de unión descrita en la presente, opcionalmente donde la composición se administra a un sujeto.

Además, se proporcionan diversas modalidades que pueden aplicarse a cualquier aspecto comprendido por la presente invención y/o combinarse con cualquier otra modalidad descrita en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, una célula es una célula alogénica, célula singénica o célula autóloga. En otra modalidad, una célula es una célula hospedadora descrita en la presente o una población de células hospedadoras descritas en la presente. En aun otra modalidad, una célula diana es una célula cancerosa que expresa MAGEA1. En aun otra modalidad, una composición celular comprende, además, un portador farmacéuticamente

aceptable. En otra modalidad, una composición celular induce una respuesta inmunitaria contra la célula diana que expresa MAGEA1 en el sujeto. En aun otra modalidad, una composición celular induce una respuesta inmunitaria de células T específica del antígeno contra la célula diana que expresa MAGEA1 en el sujeto. En aun otra modalidad, una respuesta inmunitaria de células T específica del antígeno comprende al menos una de una respuesta de células T auxiliares (Th) CD4⁺ y una respuesta de células T citotóxicas (CTL) CD8⁺. En otra modalidad, un método comprende, además, administrar al menos un tratamiento adicional para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, opcionalmente donde al menos un tratamiento adicional para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 se administra simultánea o secuencialmente con la composición. En aun otra modalidad, un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es un cáncer o recaída de este, opcionalmente donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma invasivo de mama y carcinoma urotelial de vejiga. En aun otra modalidad, un sujeto es un modelo animal de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o un mamífero, opcionalmente donde el mamífero es un ser humano, un primate o un roedor.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la expresión génica de ácidos nucleicos de MAGEA1 en un panel extenso de tipos tumorales y tejidos normales y demuestra, además, que MAGEA1 se expresa con frecuencia en varias indicaciones diana, lo que permite la terapia TCR-T multiplexada. La **Figura 2A - Figura 2E** demuestran la identificación de un péptido antigénico MAGEA1 y restricción de HLA. Se evaluaron secuencias peptídicas superpuestas de MAGEA1 para predecir la unión con HLA-C*07:02. Los péptidos de unión MHC con mejor predicción se sintetizaron y utilizaron para pulsar células HEK293T que expresan HLA-C*07:02. La reactividad de las células T transducidas por TCR se midió usando el informante granzima-IFP. La Figura 2A muestra los resultados y las frecuencias de un conjunto de células T transducidas por TCR cultivadas conjuntamente con células HEK293T que expresan un informante fluorescente activado por granzima, seis alelos HLA: A*01:01, A*03:01, B*07:02, B*08:01, C*07:01 y C*07:02, y una biblioteca superpuesta de ~600 000 péptidos 90-mer que

abarcen el proteoma humano. Los mosaicos con un enriquecimiento en veces >2,5 con secuencias peptídicas superpuestas idénticas se resaltan con puntos que corresponden al gen compartido subyacente. La Figura 2B muestra la deconvolución de HLA de MAGEA1 en C*07:02. Las células HEK293T que expresan el informante fluorescente activado por granzima y alelos HLA individuales según se indica, o los seis alelos HLA (Pt.32 6Mer) como se usan en la Figura 2A se transdujeron ± el 90-mer de MAGEA1 y se cultivaron conjuntamente con un grupo de células T transducidas por TCR. Los mapas de calor que representan las células %IFP+ para cada condición de cocultivo se muestran por triplicado. Cada fila representa una línea celular informante que expresa el HLA indicado. La nota a la derecha indica el rango de señal de IFP. La Figura 2C muestra secuencias representativas de péptidos MAGEA1 identificados en los datos del análisis. Las secuencias superpuestas (cuadro sólido) se analizaron para la predicción de la unión a HLA-C*07:02 para identificar un aglutinante con predicción superior con una secuencia VRFFFPSL. Las Figuras 2D y 2E (panel izquierdo) muestran la reactividad de las células T transducidas por TCR cultivadas conjuntamente con las células HEK293T monoalélicas de HLA-C*07:02 que expresan un informante fluorescente activado por granzima pulsado con los péptidos indicados medidos, lo que confirmó que VRFFFPSL es un epítipo de MAGEA1 mínimo. La Figura 2E (panel derecho) muestra que tanto TCR39 como TCR41 muestran afinidad similar para el péptido VRFFFPSL pulsado en células HEK293 en suspensión. Cada punto muestra el promedio de 2-3 replicados técnicos que miden los niveles de IFN γ con las desviaciones estándar indicadas.

Las **Figura 3A** y **Figura 3B** muestran la identificación de TCR reactivos a MAGEA1 de conjuntos de células T transducidas con TCR. Las células diana se transdujeron con 90-mer de MAGEA1 y se cultivaron en conjunto con un grupo de células T transducidas por TCR. TCR reactivos se identificaron mediante secuenciamiento del TCR exógeno de células positivas dobles CD137/CD69 clasificadas. La Figura 3A muestra la proporción de células que expresan los TCR indicados en las células de entrada (izquierda) y clasificadas (derecha) (TCR 32-39 y TCR 32-41 etiquetados como «39» y «41», respectivamente). La Figura 3B muestra el enriquecimiento en veces de TCR clasificados que reaccionan a células transducidas con MAGEA1 en la biblioteca de entrada.

Las **Figura 4A - Figura 4C** muestran que TCR 32-39 (también denominados TCR 39) y TCR 32-41 (también denominados TCR 41) reconocen células cancerosas que expresan MAGEA1.

La Figura 4A informa que los datos de expresión de ARNm de conjuntos de datos disponibles al público (enciclopedia de línea celular de cáncer CCLE) en transcripciones por millón (TPM). La Figura 4B demuestra la reactividad de los TCR a líneas de células de cáncer medida mediante liberación de IFN γ . La Figura 4C demuestra la reactividad de los TCR a líneas de células de cáncer medida mediante tinción doble positiva CD137/CD69.

Las **Figura 5A - Figura 5C** muestran que TCR 32-41, transducidos en células pan-T (CD3+: incluye tanto células T CD4+ como CD8+) («TSC-204-C7») reconocen células cancerosas que expresan MAGEA1. Como se describe adicionalmente a continuación, el término «TSC-204-C7» se refiere a una población de células T enteras modificadas, que incluyen células T CD8+ y células T CD4+, que expresan TCR 32-41 además de otros componentes, que incluyen CD8 α , CD8 β , y una etiqueta de enriquecimiento CD34. En algunas modalidades, TSC-204-C7 puede expresar además un DN-TGF β R11. La Figura 5A informa que los datos de expresión de ARNm de conjuntos de datos disponibles al público (enciclopedia de línea celular de cáncer CCLE) en transcripciones por millón (TPM). La Figura 5B demuestra la reactividad de los TCR transducidos en células T CD3+ o CD8+ en líneas de células de cáncer medida mediante secreción de las citocinas indicadas (IFN γ , TNF α y Granzima B). Se grafica la media $\pm$ desviación estándar (n = 3). La Figura 5C proporciona una ilustración resumida de los datos de CD3 TCR 41 de la Figura 5B.

La **Figura 6A - Figura 6C** demuestran la actividad citotóxica de TCR 32-39 o 32-41 en líneas celulares que expresan niveles variables de MAGEA1. La Figura 6A muestra que TCR 32-39 y 32-41 destruyen líneas de células de cáncer que expresan niveles altos a medios de MAGEA1 (TPM se indica para cada línea celular). La Figura 6B muestra que TCR 32-41 no destruye las líneas celulares con expresión de MAGEA1 baja a cero. Las líneas celulares indicadas se transdujeron con Incucyte® NucLight™ Red y se cultivaron conjuntamente con TCR 32-39 (triángulo), TCR 32-41 (círculo) con células T donantes no transducidas (rombo) o sin células T (cuadrado). Las células T se agregaron en las relaciones E:T indicadas al inicio del ensayo. La fluorescencia roja se midió en el tiempo con un instrumento Incucyte® y mostró la intensidad integrada roja total por pocillo normalizada al punto temporal 0. Los datos resumidos presentados como gráfica de barras se muestran debajo de cada gráfica de supervivencia celular e indican el nivel promedio de supervivencia celular a las 72 h con barras de error que representan 0,5 del intervalo (n=2). La Figura 6C proporciona una representación

simplificada de datos de las Figuras 6A y 6B pero que solamente muestra los datos de TCR 41 a una E:T de 1:1.

La **Figura 7** muestra que TCR 32-41 no demuestra alorreactividad a los 110 alelos MHC más comunes (tipos HLA). Células pan T que expresan TCR 32-41 o células T de control no transducidas se cultivaron conjuntamente con células HEK293T sin MHC que reexpresan uno de los 110 MHC de Clase I que se encuentran con mayor frecuencia en la población estadounidense durante 48 h. Se incluyó en el análisis un control positivo que consiste en células HEK293T que expresan tanto un fragmento de MAGE-A1 que contiene el epítipo (VRFFFPSL) como HLA-C*07:02. La inhibición en el crecimiento de células diana mediante las células pan T que expresan TCR 32-41 con respecto a la inhibición mediante las células T de control no transducidas se midió después de 48 h de cultivo conjunto como lectura de la reactividad de los TCR 32-41 a moléculas de MHC alogénicas. Se indica el control positivo.

La **Figura 8** muestra los resultados de un análisis *SafetyScan* de genoma completo para identificar supuestos sitios fuera de la diana para TCR 32-41. Se muestran los datos del análisis *SafetyScan* de TCR 32-41 que identifican siete posibles sitios fuera de la diana en un análisis de >600 000 fragmentos de proteína que abarcan cada proteína humana de tipo silvestre (w.t.). El análisis está diseñado para predecir al alza los sitios fuera de la diana mediante la sobreexpresión de fragmentos de proteína 90-aa, que se procesan más eficazmente que las proteínas de longitud completa. Los supuestos sitios fuera de la diana se identifican mediante nombres del gen. LAMB4-IR es una transcripción de retención de intrones específicos del cáncer predicha que nunca se identificó que se expresa en las células normales. No se detectó expresión de esta variante usando el análisis de RNA-seq de muestras de tejido normales (Human Protein Atlas).

La **Figura 9** muestra que los supuestos sitios fuera de la diana para TCR 32-41 no se reconocen como proteínas de longitud completa. La Figura 9A muestra que el cultivo conjunto de células T que expresan 32-41 con células informantes C*07:02 HEK que expresan las proteínas de longitud completa indicadas no muestran activación del informante, medida como %IFP, salvo por LAMB4-IR. Cuando se expone a diluciones del péptido con reactividad cruzada de LAMB4-IR, la Figura 9B muestra escasa reactividad de TCR 32-41 al péptido LAMB4-IR por debajo de 2000 ng/mL. Se muestra una tabla que resume los resultados obtenidos para evaluar los sitios fuera de la diana predichos del análisis *SafetyScan* del

genoma completo.

La **Figura 10** muestra que TCR 32-41 no muestra reactividad a las células humanas normales. Las células pan T que expresan TCR 32-41 o células no transducidas (NTD) se analizaron en cuanto a su reactividad a células primarias de donantes humanos HLA-C*07:02+ sanos.

5 Células diana pulsadas con el péptido MAGE-A1 o no pulsadas y cultivadas conjuntamente con células TCR 32-41 o NTD. La secreción de IFN γ en sobrenadantes de cultivo se usó como lectura de la reactividad de TCR 32-41 a las células diana. Las barras reflejan el promedio de triplicados $\pm$ SD.

10 La **Figura 11** proporciona un resumen de productos de células T TCR potenciados comprendidos por la presente invención.

Para cualquier figura que muestra un histograma de barras, curva u otros datos asociados a una leyenda, las barras, curva u otros datos presentados de izquierda a derecha para cada indicación corresponden directamente y en orden a los recuadros de arriba hacia abajo, o de izquierda a derecha, de la leyenda, a menos que se indique de otro modo.

15

Descripción detallada de la Invención

La presente descripción se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de péptidos inmunogénicos MAGEA1 (por ejemplo, los que comprenden o consisten en las secuencias enumeradas en la Tabla 1), proteínas de unión (por ejemplo, los que tienen secuencias

20 enumeradas en la Tabla 2) que reconocen antígenos MAGEA1, y sus usos. Se llevó a cabo una investigación integral sistemática para esquematizar las células T diana precisas reconocidas por un conjunto inicial de células T de interés.

Por consiguiente, la presente invención se refiere, en parte, a los epítomos identificados (péptidos inmunodominantes) de la proteína MAGEA1 terapéuticamente pertinente y las

25 composiciones relacionadas (por ejemplo, péptidos inmunodominantes, vacunas y similares), composiciones que comprenden péptidos inmunogénicos solos o con moléculas MHC, complejos de MHC-péptido estables, métodos de diagnóstico, pronóstico y control de respuestas inmunitarias a trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1, y métodos para prevenir y/o tratar trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1. La presente

30 invención también se refiere, en parte, a proteínas de unión identificadas (por ejemplo, TCR), células hospedadoras que expresan proteínas de unión (por ejemplo, TCR), composiciones

que comprenden proteínas de unión (por ejemplo, TCR) y células hospedadoras que expresan proteínas de unión (por ejemplo, TCR), métodos de diagnóstico, pronóstico y control de respuestas de células T a células que expresan MAGEA1, y métodos para prevenir y/o tratar trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1.

5

I. Definiciones

Por conveniencia, se recolectan aquí determinados términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

Los artículos «un» y «una» se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento. Además, las referencias a una tabla proporcionada en la presente comprenden todas las subtablas de la tabla a menos que se indique lo contrario.

El término «administración» significa proporcionar un agente o composición farmacéutica a un sujeto, e incluye, de modo no taxativo, administración por un profesional médico y autoadministración. Esto implica la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, utilizando cualquiera de los varios métodos y sistemas de distribución conocidos por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, las vías de administración para las proteínas de unión descritas en la presente incluyen vías de administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase «administración parenteral» como se usa en la presente significa modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, de modo no taxativo, inyección e infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbitaria, intracardíaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como electroporación *in vivo*. Alternativamente, una proteína de unión descrita en la presente se puede administrar mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, varias veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Como se usa en la presente, el término «antígeno» se refiere a cualquier sustancia inmunogénica natural o sintética, tal como una proteína, péptido o hapteno. Un antígeno puede ser un antígeno MAGEA1, o un fragmento de este, contra el que se desean respuestas inmunitarias protectoras o terapéuticas. Un «epítopo» es la parte del antígeno que se une mediante una sustancia natural o sintética.

El término «adyuvante» como se usa en la presente se refiere a sustancias que, cuando se administran antes, juntas o después de la administración de un antígeno, aceleran, prolongan y/o mejoran la calidad y/o fuerza de una respuesta inmunitaria al antígeno en comparación con la administración del antígeno solo. Los adyuvantes pueden aumentar la magnitud y la duración de la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación.

El término «anticuerpo» como se usa en la presente incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, «porciones de unión al antígeno») o cadenas simples de estos. Un «anticuerpo» se refiere, en una modalidad, a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno de estas. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. En determinados anticuerpos de origen natural, la región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. En determinados anticuerpos de origen natural, cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L consta de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de inmunoglobulina para alojar tejidos o factores, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término «célula presentadora de antígeno» o «APC» incluye células presentadoras de

antígeno profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos y oligodendrocitos).

El término «porción de unión a antígeno» de una proteína de unión, tal como un TCR, como se usa en la presente, se refiere a una o más porciones de un TCR que retienen la capacidad de unirse (por ejemplo, específica y/o selectivamente) a un antígeno (por ejemplo, un antígeno MAGEA1). Estas porciones son, por ejemplo, de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1500 aminoácidos de longitud, adecuadamente de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 745 aminoácidos de longitud, adecuadamente de aproximadamente 8 a aproximadamente 300, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 200 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o 100 aminoácidos de longitud. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un TCR se puede realizar mediante fragmentos de un TCR de longitud completa. Los ejemplos de porciones de unión abarcadas dentro de la expresión «porción de unión al antígeno» de un TCR incluyen (i) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_{α} y V_{β} de un TCR, (ii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (iii) una combinación de dos o más CDR aisladas que se pueden unir opcionalmente mediante un enlazador sintético. Además, aunque V_{α} y V_{β} , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite que se conviertan en una cadena de proteína individual en la cual las regiones V_{α} y V_{β} se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como TCR de cadena simple (scTCR)). También se propone que estos TCR de cadena simple estén comprendidos dentro de la expresión «porción de unión al antígeno» de un TCR. Estos fragmentos de TCR se pueden obtener usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad de la misma manera que las proteínas de unión completa. Las porciones de unión al antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Los términos «región determinante de complementariedad» y «CDR» son sinónimos con «región hipervariable» o «HVR» y se sabe en la técnica que se refieren a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de ciertas proteínas de unión, tal como regiones variables de TCR, que confieren especificidad de antígeno y/o afinidad de unión. Para los TCR, en general,

hay tres CDR en cada región variable de cadena α (α CDR1, α CDR2 y α CDR3) y tres CDR en cada región variable de cadena β (β CDR1, β CDR2 y β CDR3). Se cree que CDR3 es la CDR principal responsable de reconocer el antígeno procesado. Las CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC.

- 5 El término «fluido corporal» se refiere a fluidos que se excretan o secretan del cuerpo, así como a fluidos que normalmente no se excretan o secretan del cuerpo (por ejemplo, fluido amniótico, humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, fluido cefalorraquídeo, cerumen y cera de los oídos, fluido de Cowper o fluido preeyaculatorio, quilo, quimo, heces, eyaculado femenino, fluido intersticial, fluido intracelular, linfa, menstruación, leche materna, moco, fluido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, fluido sinovial, lágrimas, orina, lubricación vaginal, humor vítreo, vómito). En algunas modalidades, el fluido corporal comprende células inmunitarias, opcionalmente donde las células inmunitarias son linfocitos citotóxicos tales como células T citotóxicas y/o células NK, células T CD4+, y similares.

- 15 La expresión «región codificante» se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en residuos de aminoácidos, mientras que la expresión «región no codificante» se refiere a regiones de una secuencia de nucleótidos que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo, regiones no traducidas 5' y 3').

- El término «complementario» se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencia entre regiones de dos cadenas de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico. Se sabe que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno específicos («emparejamiento de bases») con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalelo a la primera región si el residuo es timina o uracilo. De manera similar, se sabe que un residuo de citosina de una primera cadena de ácido nucleico es capaz de emparejamiento de bases con un residuo de una segunda cadena de ácido nucleico que es antiparalelo a la primera cadena si el residuo es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria a una segunda región del mismo ácido nucleico o de un ácido nucleico diferente si, cuando las dos regiones están dispuestas de una manera antiparalela, al menos un residuo de nucleótido de la primera región es capaz de emparejamiento de bases con un residuo de la segunda región. En algunas modalidades, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo que, cuando la primera y segunda porciones se

disponen de manera antiparalela, al menos aproximadamente 50%, y, en otras modalidades, al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, o cualquier intervalo entre, inclusive, tal como al menos aproximadamente 80%-100%, de los
 5 residuos de nucleótidos de la primera porción son capaces de emparejamiento de bases con residuos de nucleótidos en la segunda porción. En algunas modalidades, todos los residuos de nucleótidos de la primera porción son capaces de emparejamiento de bases con residuos de nucleótidos en la segunda porción.

Como se usa en la presente, el término «coestimular» con referencia a células inmunitarias
 10 activadas incluye la capacidad de una molécula coestimulante para proporcionar una segunda señal mediada por receptor no activador (una «señal coestimulante») que induce proliferación o función efectora. Por ejemplo, una señal coestimulante puede dar como resultado la secreción de citocinas, por ejemplo, en una célula T que ha recibido una señal mediada por el receptor de células T. Las células inmunitarias que han recibido una señal mediada por el
 15 receptor celular, por ejemplo, a través de un receptor activador, se denominan en la presente «células inmunitarias activadas».

«CD3» se conoce en la técnica como un complejo multiproteico de seis cadenas (ver, Abbas y Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (9a edición) (2018); Janeway et ál. (Immunobiology) (9a edición) (2016)). En mamíferos, el complejo comprende una cadena de
 20 CD3 γ , una cadena de CD3 δ , dos cadenas de CD3 ϵ , y un homodímero de cadenas de CD3 ζ . Las cadenas de CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ son proteínas de superficie celular relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contienen un dominio individual de inmunoglobulina. Las regiones transmembrana de las cadenas de CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ están cargadas negativamente, que es una característica que se cree que permite que estas cadenas se
 25 asocien con regiones cargadas positivamente o residuos de cadenas de receptor de células T. Las extremidades intracelulares de las cadenas de CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ contienen cada una un motivo individual conservado conocido como un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor o IT AM, mientras que cada cadena de CD3 ζ tiene tres ITAM. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que los IT AM son importantes para la capacidad de señalización
 30 de un complejo de TCR. El CD3 usado de acuerdo con la presente invención puede ser de varias especies animales, incluyendo humano, ratón, rata, u otros mamíferos.

Un «componente de un complejo de TCR», como se usa en la presente, se refiere a una cadena de TCR (es decir, TCR α , TCR β , TCR γ o TCR δ), una cadena de CD3 (es decir, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ o CD3 ζ), o un complejo formado por dos o más cadenas de TCR o cadenas de CD3 (por ejemplo, un complejo de TCR α y TCR β , un complejo de TCR γ y TCR δ , un complejo de CD3 ϵ and CD3 δ , un complejo de CD3 γ y CD3 ϵ , o un complejo de sub-TCR de TCR α , TCR β , CD3 γ , CD3 δ , y dos cadenas de CD3 ϵ).

La expresión «receptor de antígeno quimérico» o «CAR» se refiere a una proteína de fusión que se modifica para contener dos o más secuencias de aminoácidos unidas entre sí de una manera que no se presenta de forma natural o no se presenta de forma natural en una célula hospedadora, cuya proteína de fusión puede funcionar como un receptor cuando está presente en una superficie de una célula. Los CAR abarcados por la presente invención incluyen una porción extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno (es decir, obtenido o derivado de una inmunoglobulina o molécula de tipo inmunoglobulina, tal como un TCR específico para un antígeno MAGEA1, una proteína de unión derivada de TCR de cadena individual, un scFv derivado de un anticuerpo, un dominio de unión al antígeno derivado u obtenido de un inmunorreceptor asesino de una célula NK, y similares) enlazado a un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular (tal como un dominio efector, que contiene opcionalmente uno o más dominios coestimulantes) (ver, por ejemplo, Sadelain et ál. (2013) *Cancer Discov.* 3:388; ver también Harris y Kranz (2016) *Trends Pharmacol. Sci.* 37: 220; Stone et ál. (2014) *Cancer Immunol. Immunother.* 63:1163).

Como se usa en la presente, la expresión «respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL)» se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por células T citotóxicas. Las respuestas de CTL están mediadas principalmente por células T CD8⁺.

La expresión «que consiste esencialmente en» no es equivalente a «que comprende» y se refiere a los materiales o pasos especificados de una reivindicación, o a aquellos que no afectan materialmente las características básicas de una materia reivindicada. Por ejemplo, un dominio, región o módulo de proteína (por ejemplo, un dominio de unión, región bisagra, módulo enlazador) o una proteína (que puede tener uno o más dominios, regiones o módulos) «consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos particular cuando la secuencia de aminoácidos de un dominio, región, módulo o proteína incluye extensiones, deleciones, mutaciones o una combinación de estas (por ejemplo, aminoácidos en el extremo amino o

carboxi o entre dominios) que, en combinación, contribuyen a como máximo el 20% (por ejemplo, como máximo el 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%) de la longitud de un dominio, región, módulo o proteína y no afectan substancialmente (es decir, no reducir la actividad en más de 50%, tal como no más de 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1%) la actividad de uno o más dominios, regiones, módulos o proteínas (por ejemplo, la afinidad de unión a la diana de una proteína de unión).

La expresión «determinar un régimen de tratamiento adecuado para el sujeto» se toma como la determinación de un régimen de tratamiento (es decir, una terapia individual o una combinación de diferentes terapias que se usan para la prevención y/o tratamiento de la infección viral en el sujeto) para un sujeto que se inicia, modifica y/o finaliza basado o esencialmente basado o al menos parcialmente basado en los resultados del análisis de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo es iniciar una terapia adyuvante después de la cirugía, cuyo objetivo es disminuir el riesgo de recurrencia, otro sería modificar la dosificación de una quimioterapia particular. La determinación se puede basar, además de los resultados del análisis según la presente invención, en las características personales del sujeto que se va a tratar. En la mayoría de casos, la determinación real del régimen de tratamiento adecuado para el sujeto será llevada a cabo por el médico o doctor tratante.

La expresión «receptor de TGF β negativo dominante» o «DN-TGF β R» se refiere a una variante del receptor beta o mutante del factor de crecimiento transformador (TGF) que proporciona resistencia a la señalización de TGF β . Existen cinco receptores de tipo II (receptores de activación) y siete receptores de tipo I (receptores de propagación de señalización). El receptor de TGF β activo es un heterotetrámero que consiste en dos receptores de TGF β I (TGF β RI) y dos receptores de TGF β II (TGF β RII). En algunas modalidades, el DN-TGF β R es un DN-TGF β RII (es decir, una variante o mutante del receptor de TGF beta II). En algunas modalidades, la resistencia es al efecto supresivo de la señalización de TGF β en una célula inmunitaria, tal como una célula T, donde TGF β pueden producirlo células cancerosas u otras células inmunitarias dentro de un entorno celular, tales como células estromales, macrófagos, células mieloides, células epiteliales, linfocitos citolíticos naturales y similares. Los inhibidores de señalización de TGF β son conocidos en la técnica e incluyen, de modo no taxativo, TGF β mutante que secuestra receptores e inhibe así la señalización, anticuerpos que se unen a receptores de TGF β y/o TGF β (por ejemplo, lerdelimumab, metlimumab, fressolimumab y

similares), proteínas de unión a TGF β solubles tales como partes de los receptores de TGF β que secuestran TGF β (*por ejemplo*, proteínas de fusión TGF β RII-Fc) u otros aglutinantes, tales como beta-glucanos. Todos y cualquiera de los inhibidores de señalización de TGF β conocidos se pueden usar en lugar o además de DN-TGF β R (por ejemplo, DN-TGF β RII) descrito en la presente. En algunas modalidades, un DN-TGF β R carece una parte intracelular requerida para la señalización mediada por TGF β , tal como todo el dominio intracelular, un dominio de señalización de cinasa, etc. Las construcciones de DN-TGF β R son conocidas en la técnica (ver modalidades representativas no taxativas en Brand *et ál.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:11500-11503; Weiser *et ál.* (1993) *Mol. Cell Biol.* 13:7239-7247; Bollard *et ál.* (2002) *Blood* 99:3179-3187; Publicación PCT WO 2009/152610; Publicación PCT WO 2017/156484; Kloss *et ál.* (2018) *Mol. Ther.* 26:1855-1866; Publicación PCT WO. 2019/089884; Publicación PCT WO 2020/042647; y Publicación PCT WO 2020/042648.

En algunas modalidades, los productos de células inmunitarias (por ejemplo, células T modificadas) que comprenden una o más proteínas de unión (por ejemplo, TCR) descritas en la presente son resistentes a la inmunosupresión mediada por β . Como se describió anteriormente y de manera adicional en la presente, TGF β es una citocina inmunosupresora producida por células tumorales y células en el microentorno tumoral. TGF β inhibe la función y expansión de células T citotóxicas y auxiliares Th1, lo que genera la supresión de respuestas de células T específicas del tumor (Dahmani y Delisle (2018) *Cancers* 10:194). La señalización de TGF β en las células T puede anularse mediante la expresión de un receptor de TGF β de tipo II negativo dominante (DN-TGF β RII) (Wieser *et ál.* (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13:7239-7247; Bollard *et ál.* (2002) *Blood* 99:3179-3187). Luego de la unión a TGF β , TGF β RII de tipo silvestre fosforila y, por lo tanto, activa el TGF β RI e inicia la transmisión de señal intracelular. Esta cascada de señalización es interrumpida en las células que expresan TGF β RII truncado que carece del dominio de cinasa intracelular (DN-TGF β RII), lo que hace que las células sean resistentes a la inhibición mediante TGF β . DN-TGF β RII bloquea la señalización de TGF β en las células T modificadas (tanto células CAR-T como TCR-T) (Bollard *et ál.* (2002) *Blood* 99:3179-3187; Foster *et ál.* (2008) *J. Immunother.* 31:500-505; Kloss *et ál.* (2018) *Mol. Ther.* 26:1855-1866; Alabanza *et ál.* (2022) *Front. Immunol.* 13:832645; Silk *et ál.* (2022) *J. Immunol.* 208:169-180; Li *et ál.* (2020) *Front. Oncol.* 10:1117). En un estudio representativo, la evaluación de células T específicas de EBV equipadas con DN-TGF β RII para el tratamiento

del linfoma de Hodgkin mostró que las células T modificadas con DN-TGF β RII son seguras y eficaces (Bollard *et ál.* (2018) *J. Clin. Oncol.* 36:1128-1139).

Como se usa en la presente, una «célula progenitora hematopoyética» es una célula que se puede derivar de células madre hematopoyéticas o tejido fetal y es capaz de diferenciación
5 adicional en tipos de células maduras (por ejemplo, células del sistema inmunitario). Las células progenitoras hematopoyéticas de ejemplo incluyen aquellas con un fenotipo CD24^{Lo} Lin- CD117⁺ o aquellas encontradas en el timo (denominadas timocitos progenitores).

«Homólogo», como se usa en la presente, se refiere a similitud de secuencia de nucleótidos entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico o entre regiones de dos cadenas de
10 ácido nucleico diferentes. Cuando una posición de residuo de nucleótido en ambas regiones está ocupada por el mismo residuo de nucleótido, entonces las regiones son homólogas en esa posición. Una primera región es homóloga a una segunda región si al menos una posición de residuo de nucleótido de cada región está ocupada por el mismo residuo. La homología entre dos regiones se expresa en términos de la proporción de posiciones de residuos de
15 nucleótidos de las dos regiones que están ocupadas por el mismo residuo de nucleótidos. A modo de ejemplo, una región que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-ATTGCC-3' y una región que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-TATGGC-3' comparten una homología del 50%. En algunas modalidades, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo que, al menos alrededor de 50%, y, en otras
20 modalidades, al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, o cualquier intervalo entre estos, inclusive, tal como al menos aproximadamente 80%-100%, de las posiciones de los residuos de nucleótidos de cada una de las porciones están ocupadas por el mismo residuo de nucleótidos. En algunas modalidades, todas las posiciones
25 de residuo de nucleótido de cada una de las porciones están ocupadas por el mismo residuo de nucleótido.

La expresión «respuesta inmunitaria» incluye respuestas inmunitarias mediadas por células T y/o mediadas por células B. Las respuestas inmunitarias de ejemplo incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad celular. Además, el término
30 respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que se ven afectadas indirectamente por la activación de células T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y

activación de células que responden a citocinas, por ejemplo, macrófagos.

Una mayor capacidad para estimular una respuesta inmunitaria o el sistema inmunitario, puede resultar de una mayor actividad agonista de los receptores coestimulantes de células T y/o una mayor actividad antagonista de los receptores inhibidores. Una mayor capacidad para

5 estimular una respuesta inmunitaria o el sistema inmunitario se puede reflejar por un aumento de veces de la EC_{50} o nivel máximo de actividad en un ensayo que mide una respuesta inmunitaria, por ejemplo, un ensayo que mide cambios en la liberación de citocinas o quimiocinas, actividad citolítica (determinada directamente en células diana o indirectamente a través de la detección de CD107a o granzimas) y proliferación. La capacidad de estimular

10 una respuesta inmunitaria o la actividad del sistema inmunitario se puede potenciar en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 500% o más.

La expresión «agente inmunoterapéutico» puede incluir cualquier molécula, péptido, anticuerpo u otro agente que pueda estimular un sistema inmunitario hospedador para generar

15 una respuesta inmunitaria a una infección viral en el sujeto. Diversos agentes inmunoterapéuticos son útiles en las composiciones y métodos descritos en la presente.

La expresión «célula inmunitaria» se refiere a cualquier célula del sistema inmunitario que se origina a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea, que da lugar a dos linajes principales: una célula progenitora mieloide (que da lugar a células mieloides tal como

20 monocitos, macrófagos, células dendríticas, megacariocitos y granulocitos); y una célula progenitora linfóide (que da lugar a células linfoides tal como células T, células B y células citolíticas naturales (NK)). Las células del sistema inmunitario de ejemplo incluyen una célula T $CD4^+$, una célula T $CD8^+$, una célula T $CD4$ $CD8$ doble negativa, una célula T gd, una célula T reguladora, una célula citolítica natural y una célula dendrítica. Los macrófagos y células

25 dendríticas se pueden denominar «células presentadoras de antígeno» o «APC», que son células especializadas que pueden activar células T cuando un receptor de complejo de histocompatibilidad principal (MHC) en la superficie de la APC en complejo con un péptido interactúa con un TCR en la superficie de una célula T.

Una «proteína aislada» se refiere a una proteína que está sustancialmente libre de otras

30 proteínas, material celular, medio de separación y medio de cultivo cuando se aíslan de las células o se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u

otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Una proteína «aislada» o «purificada» o una porción biológicamente activa de esta está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que deriva la proteína de unión, anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, o sustancialmente libre de

5 precusores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. La expresión «sustancialmente libre de material celular» incluye preparaciones de un polipéptido biomarcador o fragmento de este, en el que la proteína se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce recombinantemente. En una modalidad, la expresión «sustancialmente libre de material celular» incluye preparaciones
10 de una proteína biomarcadora o fragmento de esta, que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteína no biomarcadora (también denominada en la presente «proteína contaminante»), o, en algunas modalidades, menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o menos, o cualquier intervalo entre ambos inclusive, tal como menos de aproximadamente 1% a 5%, de proteína no biomarcadora. Cuando la proteína de unión,
15 anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión o fragmento de esta, por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de esta, se produce de forma recombinante, puede estar sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, o menos, o cualquier intervalo entre ambos inclusive, tal como menos de aproximadamente 1% a 5%, del volumen de la preparación de
20 proteína.

Como se usa en la presente, el término «isotipo» se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgG1, IgG2C y similares) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Como se usa en la presente, se pretende que el término « K_D » haga referencia a la constante
25 de equilibrio de disociación de una interacción proteína de unión-antígeno particular. La afinidad de unión de las proteínas de unión abarcadas por la presente invención se puede medir o determinar mediante ensayos de unión proteína de unión a diana estándar, por ejemplo, ensayos competitivos, ensayos de saturación o inmunoensayos estándar, tal como ELISA o RIA. Un valor de K_d relativamente más bajo indica una afinidad de unión relativamente
30 más alta (por ejemplo, los valores de K_d de menos de o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M (500 μ M) incluyen un valor de K_d de 1×10^{-4} M (100 μ M) y una K_d 100 μ M indica una afinidad

de unión relativamente más alta en comparación con una Kd 500 uM).

Un «kit» es cualquier fabricación (por ejemplo, un envase o contenedor) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, una sonda o molécula pequeña, para detectar y/o afectar la expresión de un marcador abarcado por la presente invención. El kit se puede promover, distribuir o vender como una unidad para realizar los métodos abarcados por la presente invención. El kit puede comprender uno o más reactivos necesarios para expresar una composición útil en los métodos comprendidos por la presente invención. En algunas modalidades, el kit puede comprender además un estándar de referencia, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína que no afecta o regula las vías de señalización que controlan el crecimiento, división, migración, supervivencia o apoptosis celular. Un experto en la técnica puede imaginar muchas de estas proteínas de control, incluyendo, de modo no taxativo, etiquetas moleculares comunes (por ejemplo, proteína fluorescente verde y beta-galactosidasa), proteínas no clasificadas en ninguna de las rutas que abarcan crecimiento celular, división, migración, supervivencia o apoptosis por referencia de GeneOntology, o proteínas de mantenimiento ubicuas. Los reactivos en el kit se pueden proporcionar en contenedores individuales o como mezclas de dos o más reactivos en un contenedor individual. Además, se pueden incluir materiales de instrucción que describen el uso de las composiciones dentro del kit.

Como se usa en la presente, el término «enlazado» se refiere a la asociación de dos o más moléculas. El enlace puede ser covalente o no covalente. El enlace también puede ser genético (es decir, fusionado de forma recombinante). Estos enlaces se pueden lograr utilizando una amplia variedad de técnicas reconocidas en la técnica, tal como conjugación química y producción de proteínas recombinantes.

Un «enlazador», en algunas modalidades, se puede referir a una secuencia de aminoácidos que conecta dos proteínas, polipéptidos, péptidos, dominios, regiones o motivos y puede proporcionar una función separadora compatible con la interacción de los dos dominios de unión secundaria de modo que el polipéptido resultante retiene una afinidad de unión específica (por ejemplo, scTCR) a una molécula diana o retiene la actividad de señalización (por ejemplo, complejo de TCR). En algunas modalidades, un enlazador se compone de aproximadamente dos a aproximadamente 35 aminoácidos, por ejemplo, o aproximadamente cuatro a aproximadamente 20 aminoácidos o aproximadamente ocho a aproximadamente 15

aminoácidos o aproximadamente 15 a aproximadamente 25 aminoácidos.

El término «MAGEA1» se refiere a un miembro particular de la familia de genes del antígeno de melanoma agrupada en el cromosoma humano Xq28 (por ejemplo, cromosoma X: 153,179,284-153,183,880 cadena positiva. GRCh38:CM000685.2) que también se conoce
 5 como antígeno de cáncer/testicular 1.1 (CT1.1); antígeno asociado a melanoma 1; MAGE1; familia de antígenos de melanoma A, 1 (dirige la expresión del antígeno MZ2-E); familia de antígenos de cáncer/testicular 1, miembro 1; antígeno asociado a melanoma MZ2-E; familia de antígenos de melanoma A1; antígeno de cáncer/testicular 1.1; antígeno de melanoma MAGE-1; antígeno MAGE-1 antigen; antígeno Z2-E, MGC9326; y MAGE1A (Mao et ál. (2019)
 10 *J. Hematol. Oncol.* 12:106; Fanipakdel et ál. (2019) *J. Cell Physiol.* 234:12080-12086; Gu et ál. (2018) *Thorac. Cancer* 9:431-438; Mecklenburg et ál. (2017) *Clin. Cancer Res.* 23:1213-1219; Wang et ál. (2016) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473:959-965; Kozakova et ál. (2015) *Cell Cycle* 14:920-930; Cannuyer et ál. (2013) *PLoS One* 8:e5874; Pereira et ál. (2012) *Oncol. Rep.* 27:1843-1848; Ogata et ál. (2011) *Ann. Surg. Oncol.* 18:1195-1203; Roch et ál. (2010)
 15 *Anticancer Res.* 30:1617-1623; Dango et ál. (2010) *Lung Cancer* 67:290-295; van der Bruggen et ál. (1991) *Science* 254:1643-1647). MAGEA1es un antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T citolíticos y se cree que está implicado en la regulación transcripcional a través de la interacción con SNW1 y recluta histona desacetilasa HDAC1, así como que inhibe la transactivación del dominio intracelular de notch (NICD), el desarrollo embrionario, la
 20 asociación con algunos trastornos hereditarios (por ejemplo, disqueratosis congénita), y/o transformación del tumor o aspectos de evolución del tumor (por ejemplo, carcinomas gástricos, carcinomas hepatocelulares, etc.). MAGEA1 no se expresa mucho en tejidos normales, salvo por los testículos, y se expresa en tumores de varios tipos histológicos tales como melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino,
 25 carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma invasivo de mama y carcinoma urotelial de vejiga.

Se pretende que el término «MAGEA1» incluya fragmentos, variantes (por ejemplo, variantes alélicas) y derivados de estos. Las secuencias de ADNc de MAGEA1 humanas y de proteína MAGEA1 humanas representativas son conocidas en la técnica y están disponibles
 30 públicamente del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (ver, por ejemplo, ncbi.nlm.nih.gov/gene/4100). Por ejemplo, MAGEA1 humana (NP_004979.3) puede

codificarse mediante la transcripción (NM_004988.5). Las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de ortólogos de MAGEA1 en organismos distintos de humanos son conocidas e incluyen, por ejemplo, MAGEA1 de chimpancé (XM_529226.2 y XP_529226.2) y MAGEA1 de ratón (Cromosoma X:155088686-155089793; Ensembl mus musculus versión 104.39 (GRCm39)). Las secuencias representativas de secuencias de MAGEA1 también se presentan más adelante en la Tabla 3.

Los anticuerpos anti-MAGEA1 adecuados para detectar la proteína MAGEA1 son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, anticuerpos AM32863PU, AM50138PU, AP06212PU, AP13128PU- TA312178, TA39275, TA339275, TA339276 y TA347677 (OriGene, Rockville, MD); anticuerpos orb167376 y orb11016 (Biorbyt, Cambridge, Reino Unido); anticuerpos A03570 y AO3570-1 (Boster Bio, Pleasanton, CA); anticuerpos E22-11B2-E9 and N1C3 (GeneTex, Irvine, CA); anticuerpos AFLGC-MAGEA1, MA5-37821 y MA1-91067 (Invitrogen, Waltham, MA); anticuerpos ABIN2782493 y ABIN2782494 (Antibodies-online, Limerick, PA); y anticuerpos MA454 y 6C1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Además, se conocen reactivos para detectar la expresión de MAGEA1. Además, múltiples construcciones de ARNip, ARNhp, CRISPR para modular la expresión de MAGEA1 se pueden encontrar en las listas de productos comerciales de diversas empresas, tales como clones de marco de lectura abierto (ORF) MG212171, MR212171, MR212171L3, MR212171L3V, MR212171L4, MR212171L4V, RC202134, RC202134L3, RC202134L3V, RC202134L4, RC202134L4V y RG202134 (OriGene, Rockville, MD), inactivaciones de CRISPR GA102785, GA202555, KN202134, KN202134BN, KN202134LP, KN202134RB, KN402134 y KN509652 (OriGene, Rockville, MD), y clones de ARN interferente (ARNi), tales como clones de ARNip y ARNhp, que incluyen SR302776, TL311617, SR410578, TL311617V, TTL516288, TL516288V, TL704467, TL04467V, TR311617, TR516288 y TR704467 (OriGene, Rockville, MD). Cabe señalar que el término se puede usar, además, para hacer referencia a cualquier combinación de características descritas en la presente en relación con moléculas de MAGEA1. Por ejemplo, cualquier combinación de composición de secuencia, porcentaje de identidad, longitud de secuencia, estructura de dominio, actividad funcional, etc., se puede usar para describir una molécula de MAGEA1 comprendida por la presente invención.

La expresión «antígeno de MAGEA1» o «antígeno peptídico de MAGEA1» o «antígeno peptídico que contiene MAGEA1» o «epítipo de MAGEA1» o «epítipo peptídico de MAGEA1»

- o «péptido de MAGEA1» se refiere a una parte inmunogénica producida de manera natural o sintética de MAGEA1. En algunas modalidades, la proteína de antígeno de MAGEA1 puede tener una longitud que oscila entre alrededor de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 aminoácidos, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como 8-15 aminoácidos. En algunas modalidades, la proteína de antígeno de MAGEA1 puede formar un complejo con una molécula de MHC (por ejemplo, HLA) de manera que una proteína de unión de la presente descripción que reconoce un complejo de péptido de MAGEA1:MHC (por ejemplo, HLA) pueda unirse (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a dicho complejo. Las secuencias de antígenos peptídicos de MAGEA1 se muestran en la Tabla 1.
- 5 La expresión «complejo de histocompatibilidad principal» (MHC) se refiere a glicoproteínas que distribuyen antígenos peptídicos a una superficie celular. Las moléculas de MHC clase I son heterodímeros que tienen una membrana que abarca una cadena (con tres dominios a) y una microglobulina de b2 no covalentemente asociada. Las moléculas de MHC clase II se componen de dos glicoproteínas transmembrana, a y b, ambas de las cuales abarcan la
- 15 membrana. Cada cadena tiene dos dominios. Las moléculas de MHC clase I distribuyen péptidos que se originan en el citosol a la superficie celular, donde un complejo de antígeno peptídico-MHC (pMHC) es reconocido por células T CD8⁺. Las moléculas de MHC clase II distribuyen péptidos que se originan en el sistema vesicular a la superficie celular, donde son reconocidos por células T CD4⁺. El MHC humano también se indica como antígeno leucocitario humano (HLA).
- 20 Las expresiones «prevenir», «previene», «prevención», «tratamiento profiláctico» y similares, hacen referencia a reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto, que no padece, pero está en riesgo de o es susceptible de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección.
- 25 El término «pronóstico» incluye una predicción de la evolución y el desenlace probable de una infección viral o la probabilidad de recuperación de la enfermedad. En algunas modalidades, el uso de algoritmos estadísticos proporciona un pronóstico de una infección viral en un individuo. Por ejemplo, el pronóstico puede ser cirugía, desarrollo de un subtipo clínico de una infección viral, desarrollo de uno o más factores clínicos, o recuperación de la enfermedad.
- 30 Como se usa en la presente, «porcentaje de identidad» entre secuencias de aminoácidos es sinónimo de «porcentaje de homología», que se puede determinar usando el algoritmo de

Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificado por Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. El algoritmo indicado se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et ál. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un polinucleótido descrito en la presente. Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a un polipéptido de referencia. Para obtener alineamientos con separaciones para fines de comparación, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul et ál. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402. Cuando se utilizan programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

La frase «portador farmacéuticamente aceptable» significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un agente de relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, o material de encapsulación de solvente, implicado al portar o transportar el compuesto en cuestión de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. El término «relación» se refiere a una relación entre dos números (por ejemplo, puntuaciones, sumas, y similares). Si bien las relaciones se pueden expresar en un orden particular (por ejemplo, a a b o a:b), un experto en la técnica reconocerá que la relación subyacente entre los números se puede expresar en cualquier orden sin perder el significado de la relación subyacente, si bien se pueden revertir la observación y correlación de las tendencias en función de la relación.

La expresión «célula hospedadora recombinante» (o simplemente «célula hospedadora») se refiere a una célula que comprende un ácido nucleico que no está naturalmente presente en la célula, tal como una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que se pretende que las células de acuerdo con la presente invención se refieran no solo a la célula en cuestión particular, sino que también abarquen la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones se pueden presentar en generaciones posteriores debido a mutación o influencias ambientales, la progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluyen dentro del alcance del término célula de acuerdo con la presente invención.

La expresión «respuesta al cáncer», «respuesta a inmunoterapia» o «respuesta a moduladores de la terapia de combinación de citotoxicidad/inmunoterapia mediada por células T» se refiere a cualquier respuesta del trastorno hiperproliferativo (por ejemplo, cáncer) a un agente canceroso, tal como un modulador de la citotoxicidad mediada por células T, y una
5 inmunoterapia, preferiblemente a un cambio en la masa y/o volumen tumoral después del inicio de la terapia neoadyuvante o adyuvante. La expresión «terapia neoadyuvante» se refiere a un tratamiento administrado antes del tratamiento primario. Los ejemplos de terapia neoadyuvante pueden incluir quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal. La respuesta al trastorno hiperproliferativo se puede evaluar, por ejemplo, para determinar la eficacia o en una
10 situación neoadyuvante o adyuvante, donde el tamaño de un tumor después de la intervención sistémica se puede comparar con el tamaño y las dimensiones iniciales medidos por CT, PET, mamografía, ultrasonido o palpación. Las respuestas también se pueden evaluar mediante medición con compás calibrador o examen patológico del tumor después de la biopsia o resección quirúrgica. La respuesta se puede registrar de manera cuantitativa como un cambio
15 en el porcentaje del volumen tumoral o de manera cualitativa como «respuesta completa patológica» (pCR, por sus siglas en inglés), «remisión clínica completa» (cCR, por sus siglas en inglés), «remisión clínica parcial» (cPR, por sus siglas en inglés), «enfermedad clínica estable» (cSD, por sus siglas en inglés), «enfermedad clínica progresiva» (cPD, por sus siglas en inglés) u otros criterios cualitativos. La evaluación de la respuesta del trastorno
20 hiperproliferativo se puede llevar a cabo poco tiempo después del inicio de la terapia neoadyuvante o adyuvante, p. ej., después de unas pocas horas, días, semanas o, preferiblemente, después de unos pocos meses. Un criterio de valoración habitual para la evaluación de la respuesta es tras la terminación de la quimioterapia neoadyuvante o tras la remoción quirúrgica de células tumorales residuales y/o el lecho tumoral. Esto se hace
25 típicamente tres meses después del inicio de la terapia neoadyuvante. En algunas modalidades, la eficacia clínica de los tratamientos terapéuticos descritos en la presente se puede determinar al medir la tasa de beneficio clínico (CBR, por sus siglas en inglés). La tasa de beneficio clínico se mide al determinar la suma del porcentaje de pacientes que están en remisión completa (CR, por sus siglas en inglés), el número de pacientes que están en remisión
30 parcial (PR, por sus siglas en inglés) y el número de pacientes que tienen enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés) en un punto de tiempo al menos 6 meses después del fin de la

terapia. La descripción abreviada para esta fórmula es $CBR=CR+PR+SD$ a los 6 meses. En algunas modalidades, la CBR para un régimen terapéutico para el cáncer particular es al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o más. Los criterios adicionales para evaluar la respuesta a terapias para el cáncer se relacionan

5 con la «supervivencia», que incluye todo lo siguiente: supervivencia hasta mortalidad, también conocida como la supervivencia global (en donde dicha mortalidad puede ser independientemente de la causa o relacionada con el tumor); «supervivencia libre de recurrencia» (en donde el término recurrencia incluirá recurrencia localizada y distante); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (en donde el término
10 incluirá cáncer y enfermedades asociadas a este). La duración de esta supervivencia se puede calcular por referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, tiempo de diagnóstico o inicio de tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para incluir la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un
15 período de tiempo dado y la probabilidad de recurrencia del tumor. Por ejemplo, para determinar los valores umbral adecuados, se puede administrar un régimen terapéutico para el cáncer particular a una población de sujetos y el resultado se puede correlacionar con las mediciones del biomarcador que se determinaron antes de la administración de cualquier terapia contra el cáncer. La medición del resultado puede ser una respuesta patológica a la
20 terapia dada en el entorno neoadyuvante. Alternativamente, las mediciones del resultado, tales como supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad se pueden monitorear durante un período de tiempo para sujetos después de la terapia contra el cáncer para los cuales se conocen los valores de la medición del biomarcador. En determinadas modalidades, las dosis administradas son dosis estándares conocidas en la técnica para agentes
25 terapéuticos para el cáncer. El período de tiempo en el que se monitorea a los sujetos puede variar. Por ejemplo, los sujetos se pueden monitorear durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 meses. Los valores umbral de medición de biomarcadores que se correlacionan con el resultado de una terapia contra el cáncer se pueden determinar usando métodos bien conocidos en la técnica, tal como aquellos descritos
30 en la sección de Ejemplos.

Como se indica, los términos también pueden referirse a un pronóstico mejorado, por ejemplo,

- como se refleja en un mayor tiempo hasta la recurrencia, que es el período hasta la primera censura de recurrencia para el segundo cáncer primario como primer evento o muerte sin evidencia de recurrencia, o una mayor supervivencia general, que es el período desde el tratamiento hasta la muerte por cualquier causa. Responder o tener una respuesta significa
- 5 que se alcanza un punto final beneficioso cuando se expone a un estímulo. Alternativamente, un síntoma negativo o nocivo se minimiza, mitiga o atenúa con la exposición a un estímulo. Se apreciará que evaluar la probabilidad de que un tumor o sujeto exhibe una respuesta favorable es equivalente a evaluar la probabilidad de que el tumor o sujeto no exhibe una respuesta favorable (es decir, exhibirá una falta de respuesta o no responderá).
- 10 El término «resistencia» se refiere a una resistencia adquirida o natural de una muestra de cáncer o un mamífero a una terapia contra el cáncer (es decir, que no responde o tiene una respuesta reducida o limitada al tratamiento terapéutico), tal como tener una respuesta reducida a un tratamiento terapéutico en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, o más, tal como 2 veces, 3
- 15 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive. La reducción en la respuesta se puede medir comparando con la misma muestra de cáncer o mamífero antes de que se adquiriera la resistencia, o comparando con una muestra de cáncer diferente o un mamífero que se sabe que no tiene resistencia al tratamiento terapéutico. Una resistencia adquirida típica a la quimioterapia se denomina
- 20 «multifarmacorresistencia». La multifarmacorresistencia puede estar mediada por P-glicoproteína o puede estar mediada por otros mecanismos, o se puede producir cuando un microorganismo o una combinación de microorganismos multifarmacorresistentes infectan a un mamífero. La determinación de la resistencia a un tratamiento terapéutico es habitual en la técnica y está dentro de las habilidades de un médico con experiencia, por ejemplo, se puede
- 25 medir mediante ensayos de proliferación celular y ensayos de destrucción celular como se describen en la presente como «sensibilizar». En algunas modalidades, la expresión «revierte la resistencia» significa que el uso de un segundo agente en combinación con una terapia para el cáncer primaria (p. ej., quimioterapia o radioterapia) es capaz de producir una disminución significativa en el volumen tumoral en un nivel de significación estadística (p. ej., $p < 0,05$)
- 30 cuando se compara con el volumen tumoral del tumor no tratado en la circunstancia donde la terapia para el cáncer primaria (p. ej., quimioterapia o radioterapia) solo no es capaz de

producir una disminución estadísticamente significativa en el volumen tumoral en comparación con el volumen tumoral del tumor no tratado. Esto generalmente se aplica a las mediciones del volumen tumoral hechas en un momento cuando el tumor no tratado está creciendo logarítmicamente.

- 5 El término «muestra» utilizado para detectar o determinar la ausencia, presencia o nivel de al menos un biomarcador es habitualmente tejido cerebral, fluido cefalorraquídeo, sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, deposición (por ejemplo, heces), lágrimas y cualquier otro fluido corporal (por ejemplo, como se describió anteriormente bajo la definición de «fluidos corporales»), o una muestra de tejido (por ejemplo, biopsia) tal como una muestra de piel, colon o tejido de resección quirúrgica. En algunas modalidades, los métodos abarcados por la presente invención comprenden además obtener la muestra del individuo antes de detectar o determinar la ausencia, presencia o nivel de al menos un marcador en la muestra.

- El término «sensibilizar» significa alterar células cancerosas o células tumorales de una manera que permite un tratamiento más eficaz contra el cáncer asociado con una terapia contra el cáncer (por ejemplo, punto de control antiinmunitario, quimioterapéutico y/o radioterapia). En algunas modalidades, las células normales no se ven afectadas en una medida que cause que las células normales se lesionen indebidamente por las terapias. Una mayor sensibilidad o una menor sensibilidad a un tratamiento terapéutico se mide según un método conocido en la técnica para el tratamiento y métodos particulares descritos en la presente más adelante, incluidos, de modo no taxativo, ensayos proliferativos celulares (Tanigawa *et ál.* (1982) *Cancer Res.* 42:2159-2164) y ensayos de muerte celular (Weisenthal *et ál.* (1984) *Cancer Res.* 94:161-173; Weisenthal *et ál.* (1985) *Cancer Treat Rep.* 69:615-632; Weisenthal *et ál.*, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentymann P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. *Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma*. Langhorne, P A: Harwood Academic Publishers, 1993:415-432; Weisenthal (1994) *Contrib. Gynecol. Obstet.* 19:82-90). La sensibilidad o resistencia también se puede medir en animales midiendo la reducción del tamaño del tumor durante un período de tiempo, por ejemplo, 6 meses para humanos y 4-6 semanas para ratones. Una composición o un método sensibiliza la respuesta a un tratamiento terapéutico si el aumento en la sensibilidad al tratamiento o la reducción en la resistencia es del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más, tal como 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15

veces, 20 veces o más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, en comparación con la sensibilidad o resistencia al tratamiento en ausencia de esta composición o método. La determinación de la sensibilidad o la resistencia a un tratamiento terapéutico es habitual en la técnica y está dentro de las habilidades de un médico con experiencia. Se entenderá que cualquier método descrito en la presente para potenciar la eficacia de una terapia contra el cáncer se puede aplicar igualmente a métodos para sensibilizar células hiperproliferativas o cancerosas de otro modo (por ejemplo, células resistentes) a la terapia contra el cáncer.

La expresión «molécula pequeña» es un término de la técnica e incluye moléculas que tienen un peso molecular menor que alrededor de 1000 o un peso molecular menor que alrededor de 500. En una modalidad, las moléculas pequeñas no comprenden exclusivamente enlaces peptídicos. En otra modalidad, las moléculas pequeñas no son oligoméricas. Los compuestos de molécula pequeña de ejemplo que se pueden cribar para actividad incluyen, de modo no taxativo, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, policétidos) (Cane *et ál.* (1998) *Science* 282: 63-68) y bibliotecas de extractos de producto natural. En otra modalidad, los compuestos son compuestos no peptídicos, orgánicos, pequeños. En una modalidad adicional, una molécula pequeña no es biosintética.

La expresión «unión específica» se refiere a la unión de la proteína de unión a un antígeno predeterminado. Habitualmente, la proteína de unión se une con una afinidad (K_D) aproximadamente menor o igual a aproximadamente 5×10^{-4} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-4} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-5} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-5} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-6} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-6} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-7} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-7} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-8} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-8} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-9} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-9} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-10} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-10} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-11} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-11} M, menor o igual a aproximadamente 5×10^{-12} M, menor o igual a aproximadamente 1×10^{-12} M, o incluso menor, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como entre aproximadamente 1-50 micromolar, 1-100 micromolar, 0,1-500 micromolar, y similares, cuando se determina mediante un ensayo de unión, tal como tecnología de

resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento de ensayo BIAcore™ que usa un antígeno de interés como analito y la proteína de unión como ligando. En algunas modalidades, la proteína de unión se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 veces mayor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases «una proteína de unión que reconoce un antígeno» y «una proteína de unión específica para un antígeno» se usan indistintamente en la presente con la expresión «una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno». La unión selectiva es un término relativo que se refiere a la capacidad de una proteína de unión para diferenciar la unión de un antígeno sobre otro, tal como un miembro de la familia particular o diana de antígeno sobre un miembro de la familia relacionado o diana de antígeno. Por ejemplo, los datos analíticos proporcionados en la sección de Ejemplos demuestran que las proteínas de unión descritas en la presente se unen específicamente a epítomos inmunogénicos de MAGEA1 y/o se unen selectivamente a varios epítomos relacionados (por ejemplo, epítomos inmunogénicos de MAGEA1 y secuencias estrechamente relacionadas) que diferencian estas dianas de la gran mayoría de otros posibles epítomos disponibles en el genoma humano.

El término «sujeto» se refiere a cualquier animal, mamífero o humano sano, o cualquier animal, mamífero o humano afligido con un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. El término «sujeto» es intercambiable con «paciente».

El término «supervivencia» incluye todo lo siguiente: supervivencia hasta la mortalidad, también conocida como supervivencia general (donde esta mortalidad puede ser independientemente de la causa o relacionada con el tumor); «supervivencia libre de recurrencia» (donde el término recurrencia incluirá tanto recurrencia localizada como distante); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (donde el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas con este). La duración de esta supervivencia se puede calcular por referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, tiempo de diagnóstico o inicio de tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para incluir la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un período de tiempo dado y la probabilidad de recurrencia del tumor.

La expresión «efecto sinérgico» se refiere al efecto combinado de dos o más agentes (por ejemplo, un agente relacionado con MAGEA1 descrito en la presente y otra terapia para tratar un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1) que es mayor que la suma de los efectos separados de los agentes/terapias contra el cáncer solos.

- 5 Como se usa en la presente, la expresión «respuesta mediada por células T» se refiere a una respuesta mediada por células T, que incluye células T efectoras (por ejemplo, células CD8⁺) y células T auxiliares (por ejemplo, células CD4⁺). Las respuestas mediadas por células T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de células T.

- 10 Un «polinucleótido transcrito» o «transcrito de nucleótidos» es un polinucleótido (por ejemplo, un ARNm, ARNhn, un ADNc o un análogo de este ARN o ADNc) que es complementario u homólogo con todo o una porción de un ARNm maduro producido por transcripción de un ácido nucleico biomarcador y procesamiento post-transcripcional normal (por ejemplo, empalme), si lo hay, del transcrito de ARN, y transcripción inversa del transcrito de ARN.

- 15 Una «célula T» es una célula del sistema inmunitario que madura en el timo y produce receptores de células T (TCR). Las células T pueden ser sin tratamiento previo (no expuestas a antígeno; expresión aumentada de CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127, y CD45RA, y expresión disminuida de CD45RO en comparación con T_{CM}), células T de memoria (T_M) (experimentadas con antígeno y de larga vida), y células efectoras (experimentadas con antígeno, citotóxicas). T_M se puede dividir además en subconjuntos de células T de memoria
- 20 central (T_{CM}, expresión aumentada de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y CD95, y expresión disminuida de CD54RA en comparación con células T sin tratamiento previo) y células T de memoria efectora (T_{EM}, expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, CD45RA y expresión aumentada de CD127 en comparación con células T sin tratamiento previo o T_{CM}). Las células T efectoras (T_E) se refieren a linfocitos T citotóxicos CD8⁺ experimentados con
- 25 antígeno que tienen expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, y son positivos para granzima y perforina en comparación con T_{CM}. Otros ejemplos de células T incluyen células T reguladoras, tal como células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3⁺) y células Tregl7, así como células T restringidas Trl, Th3, CD8⁺CD28 y Qa-1.

- 30 Las células T convencionales, también conocidas como Tconv o Teffs, tienen funciones efectoras (por ejemplo, secreción de citocinas, actividad citotóxica, anti-auto-reconocimiento y similares) para aumentar las respuestas inmunitarias en virtud de su expresión de uno o más

receptores de células T. Tcons o Teffs se definen en general como cualquier población de células T que no es un Treg e incluyen, por ejemplo, células T sin tratamiento previo, células T activadas, células T de memoria, Tcons en reposo o Tcons que se han diferenciado hacia, por ejemplo, los linajes Th1 o Th2. En algunas modalidades, Teffs son un subconjunto de

5 células T no Treg. En algunas modalidades, los Teffs son Teffs CD4⁺ o Teffs CD8⁺, tal como linfocitos T auxiliares CD4⁺ (por ejemplo, Th0, Th1, Tfh o Th17) y linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Como se describe además en la presente, las células T citotóxicas son linfocitos T CD8⁺. Los «Tcons sin tratamiento previo» son células T CD4⁺ que se han diferenciado en la médula ósea, y se han sometido con éxito a procesos positivos y negativos de selección central en un timo,

10 pero aún no se han activado por exposición a un antígeno. Los Tcon sin tratamiento previo se caracterizan comúnmente por la expresión superficial de L-selectina (CD62L), ausencia de marcadores de activación tales como CD25, CD44 o CD69, y ausencia de marcadores de memoria tales como CD45RO. Por lo tanto, se cree que los Tcon sin tratamiento previo son quiescentes y no divisibles, requieren interleucina-7 (IL-7) e interleucina-15 (IL-15) para la

15 supervivencia homeostática (ver, al menos, WO 2010/101870). La presencia y actividad de dichas células es indeseada en el contexto de la supresión de respuestas inmunitarias. A diferencia de los Treg, los Tcon no son anérgicos y pueden proliferar en respuesta a la activación del receptor de linfocito T basada en antígeno (Lechler *et ál.* (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 356:625-637).

20 Las células «T efectoras» («T_{eff}» o «T_E») se refieren a células T (por ejemplo, células T CD4⁺ y CD8⁺) con actividades citolíticas, así como células T auxiliares (Th), que secretan citocinas y activan y dirigen otras células inmunitarias, pero no incluyen células T reguladoras (células Treg).

«Receptor de células T» o «TCR» se refiere a un miembro de la superfamilia de las

25 inmunoglobulinas (que tiene un dominio de unión variable, un dominio constante, una región transmembrana y una extremidad citoplásmica corta; ver, por ejemplo, Janeway *et ál.* (1997) *Curr. Biol. Publ.* 4:33) que puede unirse (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un péptido antigénico unido a un receptor de MHC. Un TCR puede encontrarse en la superficie de una célula o en forma soluble y generalmente comprende un heterodímero que tiene

30 cadenas alfa y beta (también denominadas TCR α y TCR β , respectivamente), o cadenas γ y δ (también denominadas TCR γ y TCR δ , respectivamente). Al igual que las inmunoglobulinas

(por ejemplo, anticuerpos), la porción extracelular de las cadenas de TCR (por ejemplo, cadena α y cadena β) contiene dos dominios de inmunoglobulina: un dominio variable (por ejemplo, dominio variable de cadena α o V_α y dominio variable de cadena β o V_β ; habitualmente aminoácidos 1 a 116 con base en la numeración de Kabat (Kabat et ál. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 5.^a ed.) en el extremo N-terminal, y un dominio constante (por ejemplo, dominio constante de cadena α o C_α , habitualmente aminoácidos 117 a 259 con base en Kabat, dominio constante de cadena β o C_β , habitualmente aminoácidos 117 a 295 con base en Kabat) en el extremo C-terminal y adyacente a la membrana celular. Al igual que las inmunoglobulinas, los dominios variables contienen regiones determinantes complementarias («CDR», también llamadas regiones hipervariables o «HVR») separadas por regiones marco («FR») (ver, por ejemplo, Fores et ál. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:9138; Chothia et ál. (1988) *EMBO J.* 7:3745; Lefranc et ál. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27:55). En algunas modalidades, un TCR se encuentra en la superficie de una célula T (o linfocito T) y se asocia con el complejo de CD3. La fuente de un TCR abarcado por la presente invención puede ser de diferentes especies animales, tal como un humano, ratón, rata, conejo u otro mamífero.

La expresión «receptor de célula T» o «TCR» se debe entender que abarca TCR completos, así como porciones de unión al antígeno o fragmento de unión al antígeno de estos. En algunas modalidades, el TCR es un TCR intacto o de longitud completa, que incluye TCR en la forma $\alpha\beta$ o forma $\gamma\delta$. En algunas modalidades, el TCR es una porción de unión al antígeno que es menor que un TCR de longitud completa pero que se une a un péptido específico unido en una molécula de MHC, tal como que se une a un complejo de MHC-péptido. En algunos casos, un fragmento o porción de unión a antígeno de un TCR puede contener solo una porción de los dominios estructurales de un TCR de longitud completa o intacto, pero aun así es capaz de unirse al epítipo de polipéptido, tal como complejo MHC-péptido, al cual se une el TCR completo. En algunos casos, una porción de unión al antígeno contiene los dominios variables de un TCR, tal como cadena α variable y cadena β variable de un TCR, suficiente para formar un sitio de unión para la unión a un complejo de MHC-péptido específico. En general, las cadenas variables de un TCR contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) implicadas en el reconocimiento del péptido, MHC y/o el complejo de MHC-péptido.

La nomenclatura establecida por el International Immunogenetics Information System (IMGT) (ver también Scaviner y Lefranc (2000) *Exp. Clin. Immunogenet.* 17:83-96 y 97-106; Folch y Lefranc (2000) *Exp. Clin. Immunogenet.* 17:107-114; “T Cell Receptor Factsbook”, (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8). La IMGT proporciona secuencias

5 únicas usadas para describir un TCR, y las secuencias descritas en la presente se pueden identificar por referencia a estas secuencias únicas proporcionadas en la presente. Las secuencias de TCR están disponibles públicamente en la base de datos IMGT en imgt.org.

Como se describió anteriormente, los TCR heterodiméricos alfa/beta nativos tienen una cadena alfa y una cadena beta. En términos generales, cada cadena comprende regiones

10 variables, de unión y constantes, y la cadena beta también contiene habitualmente una región de diversidad corta entre las regiones variables y de unión, pero esta región de diversidad se considera a menudo como parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR hipervariables (regiones determinantes de complementariedad) incrustadas en una secuencia marco. Se sabe que la CDR3 es el principal mediador del reconocimiento de

15 antígenos. Hay varios tipos de regiones variables de cadena alfa ($V\alpha$) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su estructura, secuencias CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 parcialmente definida. Los tipos $V\alpha$ se mencionan en la nomenclatura IMGT por un número TRAV único. Por ejemplo, «TRAV4» define una región $V\alpha$ de TCR que tiene un marco único y secuencias CDR1 y CDR2, y una secuencia CDR3 que

20 está parcialmente definida por una secuencia de aminoácidos que se conserva de TCR a TCR pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de TCR a TCR. De manera similar, «TRBV2» define una región $V\beta$ de TCR que tiene un marco único y secuencias CDR1 y CDR2, pero con solo una secuencia CDR3 parcialmente definida. Se conoce que hay 54 genes variables alfa, de los cuales 44 son funcionales, y 67 genes variables beta, de los cuales

25 42 son funcionales, dentro de los loci alfa y beta, respectivamente.

Las regiones de unión del TCR se definen de manera similar por la nomenclatura única IMGT TRAJ y TRBJ, y las regiones constantes por la nomenclatura IMGT TRAC y TRBC. La región de diversidad de cadena beta se refiere en la nomenclatura IMGT por la abreviatura TRBD, y, como se mencionó, las regiones TRBD/TRBJ concatenadas a menudo se consideran juntas

30 como la región de unión.

Los grupos de genes que codifican las cadenas alfa y beta TCR están ubicadas en diferentes

cromosomas y contienen distintos segmentos de genes V, (D), J y C, que se juntan mediante reorganización durante el desarrollo de células T. Esto conduce a una diversidad muy alta de cadenas alfa y beta de células T debido al gran número de posibles eventos de recombinación que ocurren entre los 54 genes variables alfa de TCR y 61 genes alfa J o entre los 67 genes variables beta, dos genes beta D y 13 genes beta J. El proceso de recombinación no es preciso e introduce una diversidad adicional dentro de la región CDR3. Cada gen variable alfa y beta también puede comprender variantes alélicas, designadas en la nomenclatura IMGT como TRAVxx*01 y *02, o TRBVx-x*01 y *02 respectivamente, aumentando de este modo aún más la cantidad de variación. De la misma manera, algunas de las secuencias TRBJ tienen dos variaciones conocidas. (Tenga en cuenta que la ausencia de un calificador «*» significa que solo se conoce un alelo para la secuencia relevante). Se ha estimado que el repertorio natural de TCR humanos que resulta de la recombinación y la selección tímica comprende aproximadamente 10^6 secuencias de cadena beta únicas, determinadas a partir de la diversidad de CDR3 (Arstila et ál. (1999) *Science* 286:958-961) y podría ser incluso mayor (Robins et ál. (2009) *Blood* 114:4099-4107). Se estima que cada cadena beta se empareja con al menos 25 cadenas alfa diferentes, generando de este modo una diversidad adicional (Arstila et ál. (1999) *Science* 286:958-961).

Por lo tanto, el término «dominio variable alfa de TCR» se refiere a la concatenación de las regiones TRAV y TRAJ; una región TRAV solamente; o TRAV y una región TRAJ parcial, y el término dominio constante alfa de TCR se refiere a la región TRAC extracelular, o a una secuencia TRAC truncada en el extremo C-terminal o de longitud completa. Asimismo, el término «dominio variable beta de TCR» se refiere a la concatenación de las regiones TRBV y TRBD/TRBJ; solo a las regiones TRBV y TRBD; solo a las regiones TRBV y TRBJ; o a las regiones TRBV y TRBD parcial y/o TRBJ, y el término dominio constante beta de TCR se refiere a la región TRBC extracelular, o a una secuencia TRBC truncada o de longitud completa C-terminal. Esta nomenclatura de dominio variable de TCR alfa y dominio variable de TCR beta se aplica de manera similar a los dominios variables de las cadenas delta de TCR gamma y TCR, respectivamente, para TCR gamma/delta. Un experto en la técnica puede obtener secuencias de genes TRAV, TRAJ, TRAC, TRBV, TRBJ y TRBC, tal como a través de la base de datos IMGT disponible públicamente.

El término «complejo de TCR» se refiere a un complejo formado por la asociación de CD3 con

TCR. Por ejemplo, un complejo de TCR puede estar compuesto por una cadena de CD3 γ , una cadena de CD3 δ , dos cadenas de CD3 ϵ , un homodímero de cadenas de CD3 ζ , una cadena de TCR α y una cadena de TCR β . Alternativamente, un complejo de TCR puede estar compuesto por una cadena de CD3 γ , una cadena de CD3 δ , dos cadenas de CD3 ϵ , un homodímero de cadenas de CD3 ζ , una cadena de TCR γ , y una cadena de TCR δ .

La expresión «efecto terapéutico» se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos y más particularmente humanos, provocado por una sustancia farmacológicamente activa. Por lo tanto, el término significa cualquier sustancia que se pretende para el uso en el diagnóstico, la cura, la mitigación, el tratamiento o la prevención de una enfermedad o en la mejora de afecciones y el desarrollo físico o mental deseables en un animal o humano.

Las expresiones «cantidad terapéuticamente eficaz» y «cantidad eficaz» significan esa cantidad de una sustancia que produce algún efecto deseado, tal como un efecto terapéutico local o sistémico deseado, en al menos una subpoblación de células en un animal a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. En algunas modalidades, una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia dependerá del índice terapéutico, solubilidad, farmacocinética, semivida de la sustancia y similares. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos en cuestión se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ y la ED₅₀. En algunas modalidades, se utilizan composiciones que presentan índices terapéuticos grandes. En algunas modalidades, la LD₅₀ (dosificación letal) se puede medir y puede ser, por ejemplo, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más reducida para el agente en relación con ninguna administración del agente. De manera similar, se puede medir la ED₅₀ (es decir, la concentración que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) y puede ser, por ejemplo, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más aumentada para el agente con respecto a ninguna administración del agente. También, de manera similar, el IC₅₀ se puede medir y puede ser, por ejemplo, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más aumentado para el agente con respecto a ninguna administración del agente. En algunas

modalidades, la respuesta inmunitaria de células T en un ensayo se puede aumentar en al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso 100%. En otra modalidad, se puede lograr al menos aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso 100% de disminución en una carga viral.

El término «tratar» se refiere al manejo terapéutico o mejora de una condición (por ejemplo, una enfermedad o trastorno) de interés. El tratamiento puede incluir, pero no se limita a, administrar un agente o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) a un sujeto.

Normalmente, el tratamiento se lleva a cabo en un esfuerzo por alterar el curso de una enfermedad (término que se usa para indicar cualquier enfermedad, trastorno, síndrome o afección indeseable que justifique o potencialmente justifique la terapia) de una manera beneficiosa para el sujeto. El efecto del tratamiento puede incluir invertir, aliviar, reducir la gravedad, retrasar el inicio, curar, inhibir la progresión y/o reducir la probabilidad de aparición o recurrencia de la enfermedad o uno o más síntomas o manifestaciones de la enfermedad.

Los efectos deseados del tratamiento incluyen, de modo no taxativo, evitar la aparición o la recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la velocidad de avance de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejora en el pronóstico. Se puede administrar un agente terapéutico a un sujeto que tiene una enfermedad o que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad en relación con un miembro de la población general. En algunas modalidades, se puede administrar un agente terapéutico a un sujeto que ha tenido una enfermedad pero que ya no muestra evidencia de la enfermedad. El agente se puede administrar, por ejemplo, para reducir la probabilidad de recurrencia de enfermedad evidente. Un agente terapéutico se puede administrar profilácticamente, es decir, antes del desarrollo de cualquier síntoma o manifestación de una enfermedad. «Tratamiento profiláctico» se refiere a proporcionar tratamiento médico y/o quirúrgico a un sujeto que no ha desarrollado una enfermedad o no muestra evidencia de una enfermedad para, por ejemplo, reducir la probabilidad de que ocurra la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad en caso de que ocurra. El sujeto puede haber sido identificado como en riesgo de desarrollar la enfermedad (por ejemplo, en mayor riesgo en relación con la población general o como teniendo un factor de riesgo que aumenta la probabilidad de

desarrollar la enfermedad.

La expresión «falta de respuesta» incluye la refractividad de las células cancerosas a la terapia o la refractividad de las células terapéuticas, tal como células inmunitarias, a la estimulación, por ejemplo, estimulación a través de un receptor activador o una citocina. La falta de respuesta puede ocurrir, por ejemplo, debido a la exposición a inmunosupresores o exposición a altas dosis de antígeno. Como se usa en la presente, el término «anergia» o «tolerancia» incluye la refractividad para activar la estimulación mediada por el receptor. Dicha refractividad es generalmente específica para el antígeno y persiste después del cese de la exposición al antígeno que genera tolerancia. Por ejemplo, la anergia en células T (a diferencia de la falta de respuesta) se caracteriza por la falta de producción de citocinas, p. ej., IL-2. La anergia de células T ocurre cuando las células T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (un receptor de célula T o una señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimulante). En estas condiciones, una nueva exposición de las células al mismo antígeno (incluso si la nueva exposición se produce en presencia de un polipéptido coestimulador) tiene como resultado la incapacidad de producir citocinas y, por lo tanto, la imposibilidad de proliferar. Sin embargo, las células T anérgicas pueden proliferar si se cultivan con citocinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de células T también se puede observar por la falta de producción de IL-2 por linfocitos T como se mide por ELISA o por un ensayo de proliferación usando una línea celular indicadora. Alternativamente, se puede usar una construcción de gen indicador. Por ejemplo, las células T anérgicas no inician la transcripción del gen de IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen de IL-2 5' o por un multímero de la secuencia de AP1 que se puede encontrar dentro del potenciador (Kang et al. (1992) *Science* 257:1134).

El término «vacuna» se refiere a una composición farmacéutica que provoca una respuesta inmunitaria a un antígeno de interés. La vacuna también puede otorgar inmunidad protectora a un sujeto.

El término «región variable» o «dominio variable» se refiere al dominio de una proteína de unión a la superfamilia de inmunoglobulinas (por ejemplo, una cadena α de TCR o cadena β (o cadena γ y cadena δ para TCR $\gamma\delta$)) que está implicada en la unión de la proteína de unión a la superfamilia de inmunoglobulinas (por ejemplo, TCR) al antígeno. Los dominios variables de la cadena α y cadena β (V_α y V_β , respectivamente) de un TCR nativo generalmente tienen

estructuras similares, donde cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR. El dominio V_α está codificado por dos segmentos de ADN separados, el segmento de gen variable y el segmento de gen de unión (V-J); el dominio V_β está codificado por tres segmentos de ADN separados, el segmento de gen variable, el segmento de gen de diversidad y el segmento de gen de unión (V-D-J). Un dominio V_α o V_β individual puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los TCR que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio V_α o V_β de un TCR que se une al antígeno para examinar una biblioteca de dominios V_α o V_β complementarios, respectivamente. El término «vector» se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. En algunas modalidades, un vector es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. En algunas modalidades, los vectores son aquellos capaces de replicación y/o expresión autónoma de ácidos nucleicos a los cuales se enlazan. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se enlazan operativamente se conocen en la presente como «vectores de expresión». En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de «plásmidos» que se refieren en general a bucles de ADN de doble cadena circulares, que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, «plásmido» y «vector» se usan indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, como lo reconocerán los expertos en la técnica, la presente invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se conocen posteriormente en la técnica.

Hay una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias de nucleótidos que pueden codificar la proteína, como se define por el código genético (se muestra a continuación). Asimismo, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico particular y la secuencia de aminoácidos codificada por dicho ácido nucleico, según lo define el código genético.

CÓDIGO GENÉTICO

30	Alanina (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
	Arginina (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT

	Asparagina (Asn, N)	AAC, AAT
	Ácido aspártico (Asp, D)	GAC, GAT
	Cisteína (Cys, C)	TGC, TGT
	Ácido glutámico (Glu, E)	GAA, GAG
5	Glutamina (Gln, Q)	CAA, CAG
	Glicina (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
	Histidina (His, H)	CAC, CAT
	Isoleucina (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
	Leucina (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
10	Lisina (Lys, K)	AAA, AAG
	Metionina (Met, M)	ATG
	Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
	Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
	Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
15	Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
	Triptófano (Trp, W)	TGG
	Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
	Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
	Señal de terminación (extremo)	TAA, TAG, TGA

20

Una característica importante y conocida del código genético es su redundancia, por la cual, en la mayoría de los aminoácidos usados para producir proteínas, se puede emplear más de un triplete de nucleótidos codificante (ilustrado anteriormente). Por lo tanto, varias secuencias nucleotídicas diferentes pueden codificar una secuencia de aminoácidos dada. Dichas secuencias nucleotídicas se consideran funcionalmente equivalentes dado que dan como resultado la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (aunque ciertos organismos pueden traducir algunas secuencias de manera más eficaz que otros). Además, ocasionalmente, se puede encontrar una variante metilada de una purina o pirimidina en una secuencia de nucleótidos dado. Dichas metilaciones no afectan la relación codificante entre el codón trinucleotídico y el aminoácido correspondiente.

30

En vista de lo dicho anteriormente, la secuencia de nucleótidos de un ADN o ARN que codifica

un ácido nucleico biomarcador (o cualquier porción de este) se puede usar para derivar la secuencia de aminoácidos del polipéptido, al usar el código genético para traducir el ADN o ARN en una secuencia de aminoácidos. Asimismo, para la secuencia de aminoácidos del polipéptido, se pueden deducir secuencias nucleotídicas correspondientes que pueden codificar el polipéptido a partir del código genético (que, debido a su redundancia, producirá múltiples secuencias de ácido nucleico para cualquier secuencia de aminoácidos dada). Por lo tanto, la descripción y/o divulgación en la presente de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido deberá considerarse que también incluye la descripción y/o divulgación de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. De manera similar, la descripción y/o divulgación de una secuencia de aminoácidos de polipéptido en la presente deberá considerarse que también incluye la descripción y/o divulgación de todas las secuencias nucleotídicas posibles que pueden codificar la secuencia de aminoácidos.

II. Péptidos

En determinados aspectos, en la presente se proporcionan métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de trastornos asociados con la expresión de MAGEA1 a través de la inducción de una respuesta inmunitaria contra MAGEA1 o células que expresan MAGEA1 con respecto a la administración de péptidos inmunogénicos de MAGEA1, ácidos nucleicos que los codifican y/o células que los expresan, que se describen en la presente.

En determinadas modalidades, los péptidos inmunogénicos de MAGEA1 comprende (por ejemplo, consiste en) un epítipo peptídico que se selecciona de secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A. Los epítipos peptídicos descritos en la presente se pueden combinar con moléculas de MHC, tales como moléculas de HLA particulares con alelos de cadena alfa HLA particulares. Por ejemplo, los péptidos de la Tabla 1A se identificaron en asociación con un MHC cuya cadena alfa tenía un serotipo HLA-C*07, como el codificado por un alelo HLA-C*0702, como se describe más adelante en la sección de Ejemplos. En algunas modalidades, los péptidos inmunogénicos MAGEA1 se pueden combinar con una molécula MHC, donde la molécula MHC comprende una cadena alfa MHC que es un serotipo HLA seleccionado del grupo que consiste en HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*01, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-C*07, HLA-C*01, HLA-C*02, HLA-C*03, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14, HLA-C*15, HLA-C*16, HLA-

C*17 y HLA-C*18, opcionalmente donde el alelo HLA se selecciona del grupo que consiste en HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0212, HLA-A*0213, HLA-A*0214, HLA-A*0216, HLA-A*0217, HLA-A*0219, HLA-A*0220, HLA-A*0222, HLA-A*0224, HLA-A*0230, HLA-A*0242, HLA-A*0253, HLA-A*0260, alelo HLA-A*0274, HLA-A*0301, HLA-A*0302, HLA-A*0305, HLA-A*0307, HLA-A*0101, HLA-A*0102, HLA-A*0103, alelo HLA-A*0116, HLA-A*1101, HLA-A*1102, HLA-A*1103, HLA-A*1104, HLA-A*1105, alelo HLA-A*1119, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2405, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2410, HLA-A*2414, HLA-A*2417, HLA-A*2420, HLA-A*2422, HLA-A*2425, HLA-A*2426, alelo HLA-A*2458, HLA-B*0702, HLA-B*0704, HLA-B*0705, HLA-B*0709, HLA-B*0710, HLA-B*0715, HLA-B*0721, HLA-C*0702, HLA-C*0701, HLA-C*0401, HLA-C*0602, HLA-C*0304, HLA-C*0501, HLA-C*1601, HLA-C*0202, HLA-C*0303, HLA-C*1203, HLA-C*0802, HLA-C*0102, HLA-C*1701, HLA-C*1502, HLA-C*1402, HLA-C*1202, HLA-C*0704, HLA-C*0801, HLA-C*0302, HLA-C*1801, HLA-C*1505, HLA-C*1602, HLA-C*0804, HLA-C*0305 y alelo HLA-C*1403. En algunas modalidades, los péptidos inmunogénicos de MAGEA1 derivan de una proteína MAGEA1 humana y/o una proteína MAGEA1 que se muestra en la Tabla 3. En algunas modalidades, uno o más péptidos inmunogénicos de MAGEA1 se administran solos o junto con un adyuvante.

En determinados aspectos, en la presente se proporcionan composiciones que comprenden uno o más péptidos inmunogénicos de MAGEA1 descritos en la presente y un adyuvante.

Tabla 1: Epítomos de MAGEA1

Tabla 1A

Epítomos de MAGEA1 presentados por serotipo HLA HLA-C*07 (los epítomos en negrita resaltan la reactividad presentada en la presente)

Epítomos peptídicos
VRFFFPSL
FFFPSLREA
ARVRFFFPSL
VRFFFPSLR

RVRFFFPSL
RVRFFFPSLR
FFPSLREA
ARVRFFFPSLR
SARVRFFF
VRFFFPSLREA
RFFFPSLREA

*En la Tabla 1, tal como la Tabla 1A, se incluyen epítomos peptídicos, así como moléculas polipeptídicas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o más identidad en su longitud completa con una secuencia de aminoácidos de cualquier secuencia enumerada en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A, o una porción de esta. Dichos polipéptidos pueden tener una función del péptido o polipéptido de longitud completa como se describe adicionalmente en la presente.

- 10 En algunas modalidades, en la presente se proporcionan polipéptidos de MAGEA1 y/o ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de MAGEA1. En algunas modalidades, los polipéptidos de MAGEA1 son polipéptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos de longitud suficiente para provocar una respuesta inmunitaria específica para MAGEA1. En determinadas modalidades, el polipéptido de MAGEA1 también incluye aminoácidos que no corresponden a
- 15 la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de MAGEA1 y una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína o polipéptido distinto de MAGEA1). En algunas modalidades, el polipéptido de MAGEA1 solamente incluye una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína de MAGEA1 o fragmento de este.
- 20 En algunas modalidades, el polipéptido de MAGEA1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste esencialmente en o consiste en al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91,

92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 373, o más, o cualquier intervalo entre aminoácidos consecutivos inclusivos (por ejemplo, 7-25, 8-22, 9-22, etc.) de una secuencia de aminoácidos de proteína de MAGEA1, como las que se establecen

5 en la Tabla 3. En algunas modalidades, los aminoácidos consecutivos son idénticos a una secuencia de aminoácidos de MAGEA1 que se establece en la Tabla 3. En algunas modalidades, los polipéptidos de MAGEA1 comprenden, consisten esencialmente en o consisten en uno o más epítomos peptídicos que se seleccionan del grupo que consiste en los epítomos peptídicos de MAGEA1 enumerados en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A.

10 Como lo saben los expertos en la técnica, los polipéptidos con similitudes de secuencias sustanciales pueden provocar una reacción inmunitaria idéntica o muy similar en un animal hospedador. Por consiguiente, en algunas modalidades, un derivado, equivalente, variante, fragmento o mutante de un péptido inmunogénico de MAGEA1 descrito en la presente o un fragmento de este también puede ser adecuado para los métodos y las composiciones que se
15 proporcionan en la presente.

En algunas modalidades, las variaciones o los derivados de los polipéptidos inmunogénicos de MAGEA1 se proporcionan en la presente. El polipéptido alterado puede tener una secuencia de aminoácidos alterada, por ejemplo, mediante sustitución conservadora, y aún provocar respuestas inmunitarias que reaccionan con el antígeno de proteína inalterado, y se
20 consideran equivalentes funcionales. Como se usa en la presente, la expresión «sustitución conservadora» denota el remplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Se sabe en la técnica que los aminoácidos dentro del mismo grupo conservador comúnmente pueden sustituirse entre sí sin afectar sustancialmente la función de una proteína. De acuerdo con determinadas modalidades, el derivado, equivalentes, variantes
25 o mutantes del dominio unido al ligando de un péptido inmunogénico de MAGEA1 son polipéptidos que son al menos 85% homólogos a la secuencia de un péptido inmunogénico de MAGEA1 descrito en la presente o un fragmento de este. En algunas modalidades, la homología es de al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o más.

Los péptidos inmunogénicos comprendidos por la presente invención pueden comprender un
30 epítomo peptídico derivado de una proteína MAGEA1, tales como los enumerados en la Tabla 1, tal como la Tabla A. En algunas modalidades, el péptido inmunogénico tiene 8, 9, 10, 11,

12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos peptídicos se modifican, lo que puede incluir mutaciones conservadoras o no conservadoras. Un péptido puede comprender como máximo 1, 2, 3, 4 o más mutaciones. En algunas modalidades, un péptido puede comprender al menos 1, 2, 3, 4 o más mutaciones. En algunas modalidades, un péptido se puede modificar químicamente.

En algunas modalidades, un péptido se puede modificar químicamente. Por ejemplo, un péptido se puede mutar para modificar propiedades peptídicas tal como detectabilidad, estabilidad, biodistribución, farmacocinética, semivida, carga superficial, hidrofobicidad, sitios de conjugación, pH, función y similares. La N-metilación es un ejemplo de metilación que puede ocurrir en un péptido de la descripción. En algunas modalidades, un péptido se puede modificar mediante metilación en aminos libres tales como mediante metilación reductora con formaldehído y cianoborohidruro de sodio.

Una modificación química puede comprender un polímero, un poliéter, polietilenglicol, un biopolímero, un polímero zwitteriónico, un poliaminoácido, un ácido graso, un dendrímero, una región Fc, una cadena de carbono saturado simple, tal como palmitato o miristolato, o albúmina. La modificación química de un péptido con una región Fc puede ser una fusión Fc-péptido. Un poliaminoácido puede incluir, por ejemplo, una secuencia de poliaminoácidos con aminoácidos simples repetidos (por ejemplo, poliglicina) y una secuencia de poliaminoácidos con secuencias de poliaminoácidos mixtas que pueden seguir un patrón o no, o cualquier combinación de los anteriores. En algunas modalidades, los péptidos comprendidos por la presente descripción se pueden modificar de manera que la modificación aumente la estabilidad y/o la semivida de los péptidos. En algunas modalidades, la unión de un resto hidrofóbico, tal como el extremo N, el extremo C o un aminoácido interno, se puede usar para extender la semivida de un péptido comprendido por la presente descripción. En otras modalidades, un péptido puede incluir las modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, metilación y/o amidación), que pueden afectar, por ejemplo, la semivida en suero. En algunas modalidades, las cadenas de carbono simples (por ejemplo, mediante miristoilación y/o palmitilación) se pueden conjugar con las proteínas o péptidos de fusión. En algunas modalidades, las cadenas de carbono simples pueden hacer que las proteínas o péptidos de fusión se separen fácilmente del material no conjugado. Por ejemplo, los métodos que se pueden usar para separar las proteínas o péptidos de fusión del material no conjugado

incluyen, de modo no taxativo, extracción de solventes y cromatografía de fase inversa. Los restos lipofílicos pueden extender la semivida a través de unión reversible a albúmina de suero. Los restos conjugados pueden ser restos lipofílicos que extienden la semivida de los péptidos a través de unión reversible a albúmina de suero. En algunas modalidades, el resto lipofílico

5 puede ser colesterol o un derivado de colesterol, que incluye colestenos, colestanos, colestadienos y oxiesteroles. En algunas modalidades, los péptidos pueden conjugarse con ácido mirístico (ácido tetradecanoico) o un derivado de este. En otras modalidades, un péptido puede acoplarse (por ejemplo, conjugarse) con un agente que modifica la semivida. Los ejemplos de agentes que modifican la semivida incluyen, de modo no taxativo: un polímero,

10 un poletilenglicol (PEG), un almidón de hidroxietilo, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua, un polímero soluble en agua zwitteriónica, un poli(aminoácido) soluble en agua, un polímero soluble en agua de prolina, alanina y serina, un polímero soluble en agua que contiene glicina, ácido glutámico y serina, una región Fc, un ácido graso, ácido palmítico o una molécula que se une a albúmina. En algunas modalidades, un espaciador o enlazador puede

15 acoplarse con un péptido, tal como 1, 2, 3, 4, o más residuos de aminoácidos que sirven como un espaciador o enlazador para facilitar la conjugación o fusión a otra molécula, así como para facilitar la escisión del péptido de dichas moléculas conjugadas o fusionadas. En algunas modalidades, las proteínas o péptidos de fusión se pueden conjugar con otros restos que, por ejemplo, pueden modificar o efectuar cambios en las propiedades de los péptidos.

20 Un péptido puede, en algunas modalidades, unirse covalentemente a un resto. En algunas modalidades, el resto enlazado covalentemente comprende una etiqueta de afinidad. La etiqueta de afinidad se puede seleccionar del grupo que consiste en una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a calmodulina (CBP), etiqueta de proteína C, etiqueta Myc, HaloTag, etiqueta HA, etiqueta Flag®, etiqueta His, etiqueta biotina y etiqueta V5. La

25 etiqueta puede ser una proteína fluorescente. En algunas modalidades, el resto unido covalentemente se selecciona del grupo que consiste en un agente inflamatorio, un agente antiinflamatorio, una citocina, a toxina, una molécula citotóxica, un isótopo radioactivo o un anticuerpo, tal como un Fv de cadena simple.

Un péptido puede estar conjugado con un agente utilizado en imagenología, investigación,

30 agentes terapéuticos, teragnóstico, agentes farmacéuticos, quimioterapia, terapia de quelación, administración de fármacos dirigidos y radioterapia. En algunas modalidades, un

péptido puede conjugarse o fusionarse con agentes detectables, tal como un fluoróforo, un tinte infrarrojo, un agente de contraste, una nanopartícula, una nanopartícula que contiene metal, un quelato metálico, un agente de contraste de rayos X, un agente PET, un metal, un radioisótopo, un tinte, quelante radionúclido u otro material adecuado que se pueda usar en imagenología. En algunas modalidades, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más restos detectables se pueden unir a un péptido. Ejemplos no taxativos de radioisótopos incluyen emisores alfa, emisores beta, emisores de positrones y emisores gamma. En algunas modalidades, el metal o radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio, cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio, polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio, talio e itrio. En algunas modalidades, el metal es actinio, bismuto, plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas modalidades, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212. En algunas modalidades, los tintes de infrarrojo cercano no se extinguen fácilmente por los tejidos y fluidos biológicos. En algunas modalidades, el fluoróforo es un agente fluorescente que emite radiación electromagnética a una longitud de onda entre 650 nm y 4000 nm, estas emisiones se utilizan para detectar este agente. Ejemplos no taxativos de colorantes fluorescentes que se pueden usar como molécula de conjugación incluyen DyLight®-680, DyLight®-750, VivoTag®-750, DyLight®-800, IRDye®-800, VivoTag®-680, Cy5.5, ZQ800 o verde de indocianina (ICG). En algunas modalidades, los colorantes de infrarrojo cercano a menudo incluyen colorantes de cianina (por ejemplo, Cy7, Cy5.5, y Cy5). Ejemplos no taxativos adicionales de colorantes fluorescentes para su uso como una molécula de conjugación en la presente descripción incluyen naranja o amarillo de acradina, Alexa Fluors® (por ejemplo, Alexa Fluor® 790, 750, 700, 680, 660 y 647) y cualquier derivado de estos, ácido 7-actinomicina D, 8-anilina-naftaleno-1-sulfónico, colorante ATTO y cualquier derivado de este, tinción de auramina-rodamina y cualquier derivado de este, bensantrona, bimano, 9-10-bis (feniletinil)antraceno, 5,12-bis(feniletinil) natakeno, bisbencimida, arco cerebral, calceína, carbodifluoresceína y cualquier derivado de este, 1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno y cualquier derivado de este, DAPI, DiOC6, DyLight Fluors y cualquier derivado de estos, epicocconona, bromuro de etidio, FIAsh-EDT2, colorante Fluo y cualquier derivado de estos, FluoProbe y cualquier derivado de estos, fluoresceína y cualquier derivado de estos, Fura y cualquier derivado de estos, GelGreen y cualquier derivado de estos, GelRed y cualquier derivado de estos, proteínas fluorescentes y cualquier derivado de estos, proteínas

de isoformas m y cualquier derivado de estos tal como, por ejemplo, mCherry, colorante de hetametina y cualquier derivado de estos, tinción de hoeschst, iminocoumarina, amarillo indio, indo-1 y cualquier derivado de estos, laurdan, amarillo lucifer y cualquier derivado de estos, luciferina y cualquier derivado de estos, luciferasa y cualquier derivado de estos, mercocianina y cualquier derivado de estos, colorantes de nilo y cualquier derivado de estos, perileno, 5 floxina, colorante fico y cualquier derivado de estos, yoduro de propio, piranina, rodamina y cualquier derivado de estos, ribogreen, RoGFP, rubreno, estilbeno y cualquier derivado de estos, sulforrodamina y cualquier derivado de este, SYBR™ y cualquier derivado de estos, sinapto-pHluorina, tetrafenil butadieno, tetrasodio tris, rojo Texas, amarillo Titan, TSQ, 10 umbeliferona, violantrona, proteína fluorescente amarilla y YOYO-1. Otros colorantes fluorescentes adecuados incluyen, de modo no taxativo, colorantes de fluoresceína y fluoresceína (por ejemplo, isotiocianina de fluoresceína o FITC, naftofluoresceína, 4', 5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína o FAM, etc.), carbocianina, merocianina, colorantes de estirilo, colorantes de oxonol, ficoeritrina, eritrosina, eosina, 15 colorantes de rodamina (por ejemplo, carboxitetrametil-rodamina o TAMRA, carboxirrodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), lisamina rodamina B, rodamina 6G, rodamina verde, rodamina rojo, tetrametil-rodamina (TMR), etc.), cumarina y colorantes de cumarina (por ejemplo, metoxicumarina, dialquilaminocumarina, hidroxicumarina, aminometilcumarina (AMCA), etc.), colorantes Oregon Green® (por ejemplo, Oregon Green® 488, Oregon Green® 500, Oregon 20 Green® 514, etc.), Texas Red, Texas Red-X, SPECTRUM RED, SPECTRUM GREEN, tintes de cianina (por ejemplo, CY-3, Cy-5, CY-3.5, CY-5.5, etc.), tintes ALEXA FLUOR® (por ejemplo, ALEXA FLUOR® 350, ALEXA FLUOR® 488, ALEXA FLUOR® 532, ALEXA FLUOR® 546, ALEXA FLUOR® 568, ALEXA FLUOR® 594, ALEXA FLUOR® 633, ALEXA FLUOR® 660, ALEXA FLUOR® 680, etc.), tintes BODIPY® (por ejemplo, BODIPY® FL, BODIPY® R6G, 25 BODIPY® TMR, BODIPY® TR, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 564/570, BODIPY® 576/589, BODIPY® 581/591, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, etc.), IRDyes (por ejemplo, IRD40, IRD 700, IRD 800, etc.), y similares. Los agentes detectables adecuados adicionales se describen en PCT/US14/56177. Ejemplos no taxativos de radioisótopos incluyen emisores alfa, emisores beta, emisores de positrones y emisores gamma. En algunas 30 modalidades, el metal o radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio, cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio,

polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio, talio e itrio. En algunas modalidades, el metal es actinio, bismuto, plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas modalidades, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212.

- Un péptido puede conjugarse con un radiosensibilizador o fotosensibilizador. Los ejemplos de radiosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a: ABT-263, ABT-199, WEHI-539, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, gemcitabina, etanidazol, misonidazol, tirapazamina, y derivados de bases de ácido nucleico (por ejemplo, purinas o pirimidinas halogenadas, tal como 5-fluorodesoxiuridina). Los ejemplos de fotosensibilizadores incluyen, pero no se limitan a: moléculas fluorescentes o cuentas que generan calor cuando se iluminan, nanopartículas, porfirinas y derivados de porfirina (por ejemplo, clorinas, bacterioclorinas, isobacterioclorinas, ftalocianinas, y naftalocianinas), metaloporfirinas, metaloftalocianinas, angelicinas, colorantes de chalcogenapyrrillium, clorofilas, cumarinas, flavinas y compuestos relacionados tal como aloxazina y riboflavina, fullerenos, feofórbidos, pirofeofórbidos, cianinas (por ejemplo, merocianina 540), feofitinas, zafirinas, texafirinas, purpurinas, porfíricos, fenotiazinios, derivados del azul de metileno, naftalimidas, derivados del azul del nilo, quinonas, perilenquinonas (por ejemplo, hipericinas, hipocrelinas, y cercosporinas), psoralenos, quinonas, retinoides, rodaminas, tiofenos, verdes, tintes de xanteno (por ejemplo, eosinas, eritrosinas, bengalas rosadas), formas diméricas y oligoméricas de porfirinas, y profármacos tal como ácido 5-aminolevulínico. Ventajosamente, este enfoque permite el direccionamiento altamente específico de células de interés (por ejemplo, células inmunitarias) usando tanto un agente terapéutico (por ejemplo, fármaco) como energía electromagnética (por ejemplo, radiación o luz) simultáneamente. En algunas modalidades, el péptido se fusiona con, o se enlaza covalentemente o no covalentemente al agente, por ejemplo, directamente o mediante un enlazador.
- En algunas modalidades, la proteína de unión se puede modificar químicamente. Por ejemplo, una proteína de unión se puede mutar para modificar propiedades peptídicas tal como detectabilidad, estabilidad, biodistribución, farmacocinética, semivida, carga superficial, hidrofobicidad, sitios de conjugación, pH, función y similares. La N-metilación es un ejemplo de metilación que puede ocurrir en una proteína de unión abarcada por la presente invención.
- En algunas modalidades, una proteína de unión se puede modificar por metilación en aminos libres tal como por metilación reductora con formaldehído y cianoborohidruro de sodio.

Una modificación química puede comprender un polímero, un poliéter, polietilenglicol, un biopolímero, un polímero zwitteriónico, un poliaminoácido, un ácido graso, un dendrímero, una región Fc, una cadena de carbono saturada simple tal como palmitato o miristolato, o albúmina.

La modificación química de una proteína de unión con una región Fc puede ser una proteína Fc de fusión. Un poliaminoácido puede incluir, por ejemplo, una secuencia de poliaminoácidos con aminoácidos individuales repetidos (por ejemplo, poliglicina), y una secuencia de poliaminoácidos con secuencias de poliaminoácidos mixtas que pueden o no seguir un patrón, o cualquier combinación de lo anterior.

En algunas modalidades, las proteínas de unión abarcadas por la presente invención se pueden modificar. En algunas modalidades, las modificaciones tienen una identidad de secuencia sustancial o significativa con una proteína de unión parental para generar una variante funcional que mantiene una o más actividades biofísicas y/o biológicas de la proteína de unión parental (por ejemplo, mantener la especificidad de unión a pMHC). En algunas modalidades, la mutación es una sustitución de aminoácidos conservadora.

En algunas modalidades, las proteínas de unión abarcadas por la presente invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que se presentan naturalmente. Estos aminoácidos sintéticos son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano carboxílico, norleucina, ácido α -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano carboxílico, ácido α -aminociclohexano carboxílico, ácido α -aminocicloheptano carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

Las proteínas de unión abarcadas por la presente invención se pueden glicosilar, amidar, carboxilar, fosforilar, esterificar, N-acilar, ciclar (por ejemplo, mediante un puente disulfuro), o se pueden convertir en una sal de adición de ácido y/o opcionalmente se pueden dimerizar o polimerizar, o conjugar.

En algunas modalidades, la unión de una porción hidrofóbica, tal como al extremo N-terminal,

el extremo C-terminal o un aminoácido interno, se puede utilizar para prolongar la semivida de un péptido abarcado por la presente invención. En otras modalidades, una proteína de unión puede incluir modificaciones postraduccionales (por ejemplo, metilación y/o amidación), que pueden afectar, por ejemplo, la semivida en suero. En algunas modalidades, las cadenas de carbono simples (por ejemplo, mediante miristoilación y/o palmitilación) se pueden conjugar con las proteínas de unión. En algunas modalidades, las cadenas de carbono simples pueden hacer que las proteínas de unión se puedan separar fácilmente del material no conjugado. Por ejemplo, los métodos que se pueden usar para separar las proteínas de unión del material no conjugado incluyen, pero no se limitan a, extracción con solvente y cromatografía de fase inversa. Los restos lipofílicos pueden prolongar la semivida a través de la unión reversible a albúmina de suero. Los restos conjugados pueden ser restos lipofílicos que prolongan la semivida de los péptidos a través de unión reversible a albúmina de suero. En algunas modalidades, el resto lipofílico puede ser colesterol o un derivado de colesterol, que incluye colestenos, colestanos, colestadienos y oxiesteros. En algunas modalidades, las proteínas de unión pueden conjugarse con ácido mirístico (ácido tetradecanoico) o un derivado de este. En otras modalidades, una proteína de unión puede acoplarse (por ejemplo, conjugarse) con un agente que modifica la semivida. Los ejemplos de agentes que modifican la semivida incluyen, de modo no taxativo: un polímero, un poletilenglicol (PEG), un almidón de hidroxietilo, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua, un polímero soluble en agua zwitteriónica, un poli(aminoácido) soluble en agua, un polímero soluble en agua de prolina, alanina y serina, un polímero soluble en agua que contiene glicina, ácido glutámico y serina, una región Fc, un ácido graso, ácido palmítico o una molécula que se une a albúmina. En algunas modalidades, un espaciador o enlazador puede acoplarse con una proteína de unión, tal como 1, 2, 3, 4, o más residuos de aminoácidos que sirven como un espaciador o enlazador para facilitar la conjugación o fusión a otra molécula, así como para facilitar la escisión del péptido de dichas moléculas conjugadas o fusionadas. En algunas modalidades, las proteínas de unión se pueden conjugar con otros restos que, por ejemplo, pueden modificar o efectuar cambios en las propiedades de las proteínas de unión.

Una proteína tal como un péptido se puede producir de forma recombinante o sintética, tal como mediante síntesis de péptidos en fase sólida o síntesis de péptidos en fase de solución. La síntesis de proteínas se puede realizar mediante métodos sintéticos conocidos, tal como

usando química de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) o mediante química de butiloxycarbonilo (Boc). Los fragmentos de proteína se pueden unir entre sí enzimática o sintéticamente.

En un aspecto abarcado por la presente invención, en la presente se proporcionan métodos para producir una proteína descrita en la presente, que comprenden las etapas de: (i) cultivar una célula hospedadora transformada que ha sido transformada por un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para una proteína de unión descrita en la presente en condiciones adecuadas para permitir la expresión de esta proteína de unión; y (ii) recuperar la proteína de unión expresada.

Los métodos útiles para aislar y purificar la proteína de unión producida de manera recombinante, a manera de ejemplo, pueden incluir obtener sobrenadantes de sistemas de célula hospedadora/vector adecuados que secretan la proteína de unión en medios de cultivo y luego concentrar los medios usando un filtro disponible comercialmente. Después de la concentración, el concentrado se puede aplicar a una única matriz de purificación adecuada o a una serie de matrices adecuadas, como una matriz de afinidad o una resina de intercambio de iones. Se puede hacer uso de una o más etapas de HPLC de fase inversa para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante. Estos métodos de purificación también se pueden emplear cuando se aísla un inmunógeno de su ambiente natural. Los métodos para la producción a gran escala de una o más proteínas de unión descritas en la presente incluyen el cultivo celular en lotes, que se monitorea y controla para mantener condiciones de cultivo adecuadas. La purificación de la proteína de unión se puede realizar de acuerdo con los métodos descritos en la presente y conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, en la presente se proporciona un ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de MAGEA1 descrito en la presente o un fragmento de este, tal como una molécula de ADN que codifica un péptido inmunogénico de MAGEA1. En algunas modalidades, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica un péptido inmunogénico de MAGEA1 descrito en la presente o un fragmento de este. En algunas modalidades, el ácido nucleico incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del marco de lectura abierto. Dichos elementos pueden incluir, por ejemplo, un promotor, un codón de inicio, un codón de terminación y una señal de poliadenilación. Además, se pueden incluir potenciadores. Estos elementos se pueden enlazar de manera operativa a una secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1 o

fragmento de este. Los vectores, promotores, elementos reguladores y similares representativos útiles para expresar proteínas, tales como péptidos, se describen de manera adicional a continuación.

5 III. Complejos MHC-péptido

En determinados aspectos, en la presente se proporcionan composiciones que comprenden un péptido inmunogénico de MAGEA1 descrito en la presente y una molécula de MHC. En algunas modalidades, el péptido inmunogénico de MAGEA1 forma un complejo estable con la molécula de MHC.

- 10 Las proteínas de MHC se pueden conjugar con un agente, tal como un resto de detección, radiosensibilizador, fotosensibilizador y similares, y/o se pueden modificar químicamente como se describió anteriormente con respecto a los péptidos.

Las proteínas de MHC proporcionadas y utilizadas en las composiciones y los métodos comprendidos por la presente descripción pueden ser cualquier molécula de MHC adecuada conocida en la técnica. En general, tienen la fórmula $(\alpha\beta\text{-P})_n$, donde n es al menos 2, por ejemplo, entre 2-10, p. ej., 4. α es una cadena α de una proteína MHC de clase I o clase II. β es una cadena β , definida en la presente como la cadena β de una proteína MHC de clase II o microglobulina β_2 para una proteína MHC de clase I. P es un antígeno peptídico.

- 20 En algunas modalidades, las proteínas MHC son complejos MHC de clase I, tales como complejos HLA I.

Las proteínas de MHC pueden ser de cualquier especie de mamífero o ave, p. ej., primate sp., particularmente humanos; roedores, lo que incluye ratones, ratas y hámsteres; conejos; equinos, bovinos, caninos, felinos; etc. Por ejemplo, la proteína de MHC puede derivarse de las proteínas HLA humanas o de las proteínas H-2 murinas. Las proteínas HLA incluyen las subunidades HLA-DP α , HLA-DP β , HLA-DQ α , HLA-DQ β , HLA-DR α y HLA-DR β de clase II, y las proteínas HLA-A, HLA-B, HLA-C de clase I, y β_2 -microglobulina. Las proteínas H-2 incluyen las subunidades H-2K, H-2D, H-2L de clase I, y las subunidades I-A α , I-A β , I-E α y I-E β de clase II, y β_2 -microglobulina. Las secuencias de algunas proteínas de MHC representativas pueden encontrarse en Kabat et ál. Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, págs. 724-815. Las subunidades de proteínas del MHC adecuadas para el uso en la presente invención son una forma soluble de la proteína unida a

la membrana de manera normal, que se prepara como se conoce en la técnica, por ejemplo, mediante la eliminación del dominio transmembrana y el dominio citoplasmático.

Para las proteínas de clase I, la forma soluble puede incluir el dominio $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Las subunidades de clase II solubles pueden incluir los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ para la subunidad α , y los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ para la subunidad β .

Las subunidades α y β pueden producirse de manera separada y permitir que se asocien in vitro para formar un complejo de heterodúplex estable, o ambos de las subunidades se pueden expresar en una célula individual. En la técnica se conocen métodos para producir subunidades de MHC.

- En determinadas modalidades, el complejo de MHC-péptido comprende un epítipo peptídico seleccionado de la Tabla 1 y un MHC. En algunas modalidades, la molécula MHC comprende una cadena alfa MHC que es un serotipo HLA seleccionado del grupo que consiste en HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*01, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-C*07, HLA-C*01, HLA-C*02, HLA-C*03, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14, HLA-C*15, HLA-C*16, HLA-C*17 y HLA-C*18, opcionalmente donde el alelo HLA se selecciona del grupo que consiste en HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0212, HLA-A*0213, HLA-A*0214, HLA-A*0216, HLA-A*0217, HLA-A*0219, HLA-A*0220, HLA-A*0222, HLA-A*0224, HLA-A*0230, HLA-A*0242, HLA-A*0253, HLA-A*0260, alelo HLA-A*0274, HLA-A*0301, HLA-A*0302, HLA-A*0305, HLA-A*0307, HLA-A*0101, HLA-A*0102, HLA-A*0103, alelo HLA-A*0116, HLA-A*1101, HLA-A*1102, HLA-A*1103, HLA-A*1104, HLA-A*1105, alelo HLA-A*1119, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2405, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2410, HLA-A*2414, HLA-A*2417, HLA-A*2420, HLA-A*2422, HLA-A*2425, HLA-A*2426, alelo HLA-A*2458, HLA-B*0702, HLA-B*0704, HLA-B*0705, HLA-B*0709, HLA-B*0710, HLA-B*0715, HLA-B*0721, HLA-C*0702, HLA-C*0701, HLA-C*0401, HLA-C*0602, HLA-C*0304, HLA-C*0501, HLA-C*1601, HLA-C*0202, HLA-C*0303, HLA-C*1203, HLA-C*0802, HLA-C*0102, HLA-C*1701, HLA-C*1502, HLA-C*1402, HLA-C*1202, HLA-C*0704, HLA-C*0801, HLA-C*0302, HLA-C*1801, HLA-C*1505, HLA-C*1602, HLA-C*0804, HLA-C*0305 y alelo HLA-C*1403. En algunas modalidades, el complejo de MHC-péptido comprende un epítipo peptídico que se selecciona de la Tabla 1A y un MHC cuya cadena alfa tiene un serotipo HLA-C*07, como el codificado por un alelo HLA-C*0702, HLA-C*0701 y/o HLA-C*0704.

Para preparar el complejo de péptido-MHC, las subunidades se pueden combinar con un péptido antigénico y permitir que se replieguen in vitro para formar un complejo de heterodímero estable con dominios unidos con disulfuro intracadena. El péptido se puede incluir en la reacción de plegado inicial, o puede agregarse al heterodímero vacío en una etapa posterior. En las composiciones y los métodos comprendidos por la presente invención, este es un péptido inmunogénico de MAGEA1 o un fragmento de este. Las condiciones que permiten el pliegue y la asociación de las subunidades y péptidos son conocidos en la técnica. Como un ejemplo, cantidades aproximadamente equimolares de subunidades α y β solubilizadas pueden mezclarse en una solución de urea. El replegamiento se inicia mediante dilución o diálisis en una solución amortiguada sin urea. Los péptidos se pueden cargar en heterodímeros de clase II vacíos a alrededor de pH 5 a 5,5 durante alrededor de 1 a 3 días, seguido por neutralización, concentración e intercambio de amortiguador. Sin embargo, las condiciones de pliegue específicas no son críticas para la práctica de la invención.

El complejo monomérico (α - β -P) (en la presente, monómero) puede multimerizarse, por ejemplo, para un tetrámero de MHC. El multímero resultante es estable en períodos de tiempo extensos. Preferentemente, el multímero pueden formarse al unir los monómeros a una entidad multivalente a través de sitios de unión específicos en la subunidad α o β , como es sabido en la técnica (p. ej., como se describe en la patente estadounidense n.º 5,635,363). Las proteínas de MHC, ya sea en sus formas monomérica o multimérica, se pueden conjugar a perlas o cualquier otro soporte.

El complejo multimérico se puede etiquetar, para que sea detectable de manera directa usada en la inmunotinción u otros métodos conocidos en la técnica, o se puede usar junto con inmunorreactivos secundarios etiquetados que se unen de manera específica y/o selectiva al complejo (por ejemplo, se unen a una subunidad de proteína MHC) como se sabe en la técnica.

Por ejemplo, la etiqueta detectable puede ser un fluoróforo, tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, rojo Texas, ficoeritrina (PE), allofocianina (APC), Brilliant Violet™ 421, Brilliant UV™ 395, Brilliant Violet™ 480, Brilliant Violet™ 421 (BV421), Brilliant Blue™ 515, APC-R700 o APC-Fire750. En algunas modalidades, el complejo multimérico se etiqueta con un resto que es capaz de unirse de manera específica y/o selectiva a otro resto.

Por ejemplo, la etiqueta puede ser biotina, estreptavidina, un oligonucleótido o un ligando. Otras etiquetas de interés pueden incluir fluorocromos, tintes, enzimas, agentes de

quimioluminiscencia, partículas, radioisótopos u otro agente detectable de manera directa o indirecta.

En algunas modalidades, una célula que presenta péptidos inmunogénicos en el contexto de una molécula de MHC en la superficie celular es generada mediante transfección o transducción de la célula con un vector (por ejemplo, un vector viral) que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno recombinante o heterólogo en una célula. En algunas modalidades, el vector se introduce en la célula en condiciones en las que uno o más antígenos peptídicos, que incluyen, en algunos casos, uno o más antígenos peptídicos de la proteína heteróloga expresada, son expresados por la célula, procesados y presentados en la superficie de la célula en el contexto de una molécula del complejo de histocompatibilidad principal (MHC).

En general, la célula con la que entra el contacto el vector es una célula que expresa MHC, es decir células que expresan MHC. La célula puede ser una célula que exprese normalmente un MHC en la superficie celular, que se induce para que exprese y/o regule por aumento la expresión de MHC en la superficie celular o que se modifica para que exprese una molécula de MHC en la superficie celular. En algunas modalidades, el MHC contiene un sitio de unión al péptido polimórfico o ranura de unión que puede, en algunos casos, formar un complejo con antígenos peptídicos de polipéptidos, que incluyen antígenos peptídicos procesados por la maquinaria celular. En algunos casos, las moléculas de MHC se pueden mostrar o expresar en la superficie celular, que incluyen un complejo con péptido, es decir, complejo de MHC-péptido, para la presentación de un antígeno en una conformación reconocible por los TCR en las células T, u otras moléculas de unión a péptidos.

En algunas modalidades, la célula es una célula nucleada. En algunas modalidades, la célula es una célula presentadora de antígenos. En algunas modalidades, la célula es un macrófago, célula dendrítica, célula B, célula endotelial o fibroblasto. En algunas modalidades, la célula es una célula endotelial, tal como una línea celular endotelial o célula endotelial primaria. En algunas modalidades, la célula es un fibroblasto, tal como una línea celular de fibroblastos o célula de fibroblastos primaria.

En algunas modalidades, la célula es una célula que presenta un antígeno artificial (aAPC). Comúnmente, las aAPC incluyen características de APC naturales, que incluyen la expresión de una molécula de MHC, moléculas estimuladoras y coestimuladoras, receptor Fc, moléculas

de adhesión y/o la capacidad de producir o secretar citocinas (por ejemplo, IL-2). Normalmente, una aAPC es una línea celular que carece de la expresión de uno o más de los anteriores, y es generada por la introducción (por ejemplo, mediante transfección o transducción) de uno o más de los elementos faltantes de entre una molécula de MHC, un receptor Fc de baja afinidad (CD32), un receptor Fc de alta afinidad (CD64), una o más de una señal coestimuladora (por ejemplo, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, ILT3, ILT4, 3/ITR6 o un ligando de B7-H3; o un anticuerpo que se une específicamente a CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, receptor de ligando Toll o un ligando de CD83), una molécula de adhesión celular (*por ejemplo*, ICAM-1 o LFA-3) y/o una citocina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, interferón-alfa (IFN.alfa.), interferón-beta (IFN.beta.), interferón-gamma (IFN.gamma.), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF.alfa.), factor de necrosis tumoral-beta (TNF.beta.), factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF)). En algunos casos, una aAPC no expresa normalmente una molécula de MHC, pero se puede modificar para que exprese una molécula de MHC o, en algunos casos, es o se puede inducir para que exprese una molécula de MHC, tal como mediante la estimulación con citocinas. En algunos casos, una aAPC también se puede cargar con un ligando estimulador, que puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 o un anticuerpo anti-CD2. Un ejemplo de línea celular que se puede usar como estructura principal para generar una aAPC es una línea celular K562 o una línea celular de fibroblastos. Varias aAPC son conocidas en la técnica, véase, *por ejemplo*, la patente estadounidense n.º 8,722,400, la solicitud publicada n.º US2014/0212446; Butler y Hirano (2014) *Immunol Rev.* 257:10. 1111/imr.12129; Suhoshki *et ál.* (2007) *Mol. Ther.* 15:981-988). Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar o identificar el MHC o alelo particular expresado por una célula. En algunas modalidades, antes de poner en contacto las células con un vector, expresión de una molécula MHC particular se puede evaluar o confirmar, tal como mediante el uso de un anticuerpo específico para la molécula de MHC particular. Los anticuerpos para moléculas de MHC son conocidos en la técnica, como los que se describen más adelante.

En algunas modalidades, las células se pueden seleccionar para expresar un alelo de MHC

de una restricción de MHC deseada. En algunas modalidades, los tipos de MHC de las células, tales como líneas celulares, son conocidos en la técnica. En algunas modalidades, los tipos de MHC de las células, tales como células primarias obtenidas de un sujeto, se pueden determinar usando procedimientos conocidos en la técnica, tal como mediante la

5 determinación de tipos de tejidos usando ensayos de haplotipo molecular (BioTest ABC SSPtray, BioTest Diagnostics Corp., Denville, N.J.; SeCore Kits, Life Technologies, Grand Island, N.Y.). En algunos casos, está dentro del nivel de un experto en la técnica realizar tipificación estándar de células para determinar el genotipo de HLA, tal como mediante el uso de tipificación basado en secuencias (SBT) (Adams *et ál.* (2004) *J. Transl. Med.*, 2:30; Smith

10 (2012) *Methods Mol Biol.*, 882:67-86). En algunos casos, la tipificación de HLA de las células, tales como fibroblastos, son conocidos. Por ejemplo, la línea celular de fibroblastos pulmonar fetal humana MRC-5 es HLA-A*0201, A29, B13, B44 Cw7 (C*0702); la línea celular de fibroblastos de prepucio humana Hs68 es HLA-A1, A29, B8, B44, Cw7, Cw16; y la línea celular WI-38 es A*6801, B*0801, (Solache *et ál.* (1999) *J Immunol*, 163:5512-5518; Ameres *et ál.*

15 (2013) *PLoS Pathog.* 9:e1003383). La línea celular de fibroblastos transfectante humana M1DR1/li/DM expresa HLA-DR y HLA-DM (Karakikes *et ál.* (2012) *FASEB J.*, 26:4886-96).

En algunas modalidades, las células con las cuales entra en contacto el vector o en el que se introduce son células modificadas o transfectadas para expresar una molécula de MHC. En algunas modalidades, las líneas celulares se pueden preparar modificando genéticamente una

20 línea celular original. En algunas modalidades, las células son normalmente deficientes en la molécula de MHC particular y se modifican para expresar dicha molécula de MHC particular. En algunas modalidades, las células se modifican genéticamente usando técnicas de ADN recombinante.

En algunas modalidades, los complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente se

25 usan para detectar células T que se unen a un complejo de MHC-péptido estable. En algunas modalidades, los complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente se usan para controlar la respuesta de las células T en un sujeto, por ejemplo, mediante la detección de la cantidad y/o el porcentaje de células T (por ejemplo, células T CD8+) que se unen específica y/o selectivamente a los complejos de MHC-péptido que se etiquetan de manera fluorescente.

30 Los métodos para generar, etiquetar y usar complejos de MHC-péptido (por ejemplo, tetrámeros de MHC-péptido) para detectar células T específicas del complejo de MHC-péptido

son conocidos en la técnica. Se puede encontrar una descripción adicional en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7,776,562; la patente estadounidense n.º 8,268,964; y la publicación de patente estadounidense 2019/0085048.

5 IV. Composiciones inmunogénicas

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas (por ejemplo, una composición de vacuna) que comprende un péptido inmunogénico de MAGEA1 y/o un ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico de MAGEA1 y un adyuvante. En algunos aspectos, en la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas (por ejemplo, una composición de vacuna) que comprende un complejo de MHC-péptido estable que comprende un péptido inmunogénico de MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC y un adyuvante. En algunas modalidades, la composición incluye una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) péptidos inmunogénicos o ácidos nucleicos de MAGEA1 y un adyuvante. En algunas modalidades, la composición incluye una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) complejos de MHC-péptido estables que comprenden un péptido inmunogénico de MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC y un adyuvante. En algunas modalidades, las composiciones descritas anteriormente comprenden además un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden formular especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluidas aquellas adaptadas para las siguientes: (1) administración oral, por ejemplo, pociones (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellos dirigidos para absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la lengua; o (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida.

Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un péptido inmunogénico y/o ácido nucleico de MAGEA1 descrito en la presente con el adyuvante, portador y, opcionalmente uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntima un agente descrito en la presente con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y si fuera necesario, dando forma posteriormente al producto.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral comprenden péptidos inmunogénicos y/o ácidos nucleicos de MAGEA1 descritos en la presente en combinación con un adyuvante, así como una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas estériles, acuosas o no acuosas, o polvos estériles farmacéuticamente aceptables que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles antes de su uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, solutos que vuelven isotónica a la formulación con la sangre del receptor o agentes de suspensión o espesantes.

Ejemplos de portadores acuosos o no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Sin perjuicio de la vía de administración seleccionada, los agentes proporcionados en la presente que se pueden usar en una forma hidratada adecuada y/o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales para aquellos expertos en la técnica.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica descrita, cuando se administra a un sujeto, puede provocar una respuesta inmunitaria contra una célula infectada por MAGEA1. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser útiles como composiciones de vacuna para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende, además, un adyuvante fisiológicamente aceptable. En algunas modalidades, el adyuvante empleado proporciona una mayor inmunogenicidad de la composición farmacéutica. Dicha respuesta inmunitaria adicional que estimula el compuesto o adyuvante (i) puede mezclarse con la composición farmacéutica de acuerdo con la invención después de la reconstitución de los péptidos y emulsificación opcional con un adyuvante de base oleosa como se definió anteriormente, (ii) puede ser parte

de la composición de reconstitución de la invención definida anteriormente, (iii) puede unirse físicamente a uno o más péptidos que se reconstituirán o (iv) puede administrarse por separado al sujeto, mamífero o humano que será tratado. El adyuvante puede ser uno que proporcione una liberación lenta del antígeno (por ejemplo, el adyuvante puede ser un liposoma) o puede ser un adyuvante que sea inmunogénico por derecho propio y funcione por lo tanto de manera sinérgica con los antígenos (es decir, antígenos presentes en el péptido inmunogénico de MAGEA1). Por ejemplo, el adyuvante puede ser un adyuvante conocido u otra sustancia que fomente la absorción del antígeno, capte las células del sistema inmunitario al sitio de administración, o facilite la activación inmunitaria de las células linfoides que presentan respuesta. Los adyuvantes incluyen, de modo no taxativo, moléculas inmunomoduladoras (por ejemplo, citocinas), emulsiones oleosas y acuosas, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, Bacto-Adyuvante, polímeros sintéticos tales como poli aminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, aceite de parafina y dipéptido de muramilo. En algunas modalidades, el adyuvante es el adyuvante 65, α -GalCer, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, péptido de β -glucano, ADN de CpG, GM-CSF, GPI-0100, IFA, IFN- γ , IL-17, lípido A, lipopolisacárido, Lipovant, Montanide, N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, Pam3CSK4, quil A, dimicolato de trehalosa o zymosan.

En algunas modalidades, el adyuvante es una molécula inmunomoduladora. Por ejemplo, la molécula inmunomoduladora puede ser una citocina, quimiocina o agente inmunoestimulante de proteína recombinante o ácido nucleico que codifica citocinas, quimiocinas o agentes inmunoestimulantes diseñados para potenciar la respuesta inmunológica.

Ejemplos de citocinas inmunomoduladoras incluyen interferones (por ejemplo, IFN α , IFN β e IFN γ), interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17 e IL-20), factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF α y TNF β), eritropoyetina (EPO), ligando FLT-3, glp10, TCA-3, MCP-1, MIF, MIP-1.alpha., MIP-1 β , Rantes, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), así como fragmentos funcionales de cualquiera de los anteriores.

En algunas modalidades, una quimiocina inmunomoduladora que se une a un receptor de quimiocina, es decir, un receptor de quimiocina CXC, CC, C o CX3C, también se puede incluir

en las composiciones proporcionadas en la presente. Los ejemplos de quimiocinas incluyen, de modo no taxativo, Mip1 α , Mip-1 β , Mip-3 α (Larc), Mip-3 β , Rantes, Hcc-1, Mpif-1, Mpif-2, Mcp-1, Mcp-2, Mcp-3, Mcp-4, Mcp-5, Eotaxina, Tarc, Elc, I309, IL-8, Gcp-2 Gro- α , Gro- β , Gro- γ , Nap-2, Ena-78, Gcp-2, Ip-10, Mig, I-Tac, Sdf-1 y Bca-1 (Blc), así como fragmentos

5 funcionales de cualquiera de los anteriores.

En algunas modalidades, la composición comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico de MAGEA1 descrito en la presente, tal como una molécula de ADN que codifica un péptido inmunogénico de MAGEA1. En algunas modalidades, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica

10 un péptido inmunogénico de MAGEA1.

Cuando se absorbe por una célula (por ejemplo, célula hospedadora, una célula que presenta antígenos (APC), tal como una célula dendrítica, macrófago, etc.), una molécula de ADN puede estar presente en la célula como una molécula extracromosómica y/o se puede integrar en el cromosoma. El ADN se puede introducir en las células en forma de un plásmido que puede

15 permanecer como material genético separado. Alternativamente, los ADN lineales que se pueden integrar en el cromosoma se pueden introducir en la célula. Opcionalmente, cuando se introduce ADN en una célula, se pueden añadir reactivos que promueven la integración del ADN en los cromosomas.

20 V. Proteínas de unión

En algunas modalidades, se proporcionan un resto de unión que se une a un péptido descrito en la presente y/o un complejo de MHC-péptido estable descrito en la presente. Por ejemplo, se proporcionan proteínas de unión como los receptores de células T (TCR), anticuerpos y similares que se unen específica y/o selectivamente al péptido y/o el complejo de MHC-péptido

25 estable, tal como con una K_d inferior o igual a alrededor de 10^{-4} M (por ejemplo, alrededor de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , alrededor de 10^{-8} , alrededor de 10^{-9} , alrededor de 10^{10} , alrededor de 10^{-11} , alrededor de 10^{-12} , alrededor de 10^{-13} , alrededor de 10^{-14} , etc.).

En un aspecto comprendido por la presente invención, en la presente se proporcionan proteínas de unión que se unen (por ejemplo, específica y/o selectivamente) a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico de MAGEA1 en el contexto

30 de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula de MHC de clase I). En algunas

modalidades, la proteína de unión puede unirse (de manera específica y/o selectiva) a un complejo de péptido de MAGEA1-MHC (pMHC) con una K_d inferior o igual a alrededor de 5×10^{-4} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-4} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-5} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-5} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-6} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-6} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-7} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-7} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-8} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-8} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-9} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-9} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-10} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-10} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-11} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-11} M, inferior o igual a alrededor de 5×10^{-12} M, inferior o igual a alrededor de 1×10^{-12} M, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como entre alrededor de 1-50 micromolar, 1-100 micromolar, 0,1-500 micromolar, y similares. En algunas modalidades, la molécula MHC comprende una cadena alfa MHC que es un serotipo HLA seleccionado del grupo que consiste en HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*01, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-C*07, HLA-C*01, HLA-C*02, HLA-C*03, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14, HLA-C*15, HLA-C*16, HLA-C*17 y HLA-C*18, opcionalmente donde el alelo HLA se selecciona del grupo que consiste en HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0212, HLA-A*0213, HLA-A*0214, HLA-A*0216, HLA-A*0217, HLA-A*0219, HLA-A*0220, HLA-A*0222, HLA-A*0224, HLA-A*0230, HLA-A*0242, HLA-A*0253, HLA-A*0260, alelo HLA-A*0274, HLA-A*0301, HLA-A*0302, HLA-A*0305, HLA-A*0307, HLA-A*0101, HLA-A*0102, HLA-A*0103, alelo HLA-A*0116, HLA-A*1101, HLA-A*1102, HLA-A*1103, HLA-A*1104, HLA-A*1105, alelo HLA-A*1119, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2405, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2410, HLA-A*2414, HLA-A*2417, HLA-A*2420, HLA-A*2422, HLA-A*2425, HLA-A*2426, alelo HLA-A*2458, HLA-B*0702, HLA-B*0704, HLA-B*0705, HLA-B*0709, HLA-B*0710, HLA-B*0715, HLA-B*0721, HLA-C*0702, HLA-C*0701, HLA-C*0401, HLA-C*0602, HLA-C*0304, HLA-C*0501, HLA-C*1601, HLA-C*0202, HLA-C*0303, HLA-C*1203, HLA-C*0802, HLA-C*0102, HLA-C*1701, HLA-C*1502, HLA-C*1402, HLA-C*1202, HLA-C*0704, HLA-C*0801, HLA-C*0302, HLA-C*1801, HLA-C*1505, HLA-C*1602, HLA-C*0804, HLA-C*0305 y alelo HLA-C*1403. En algunas modalidades, el serotipo HLA es HLA-C*07 y/o el alelo HLA se selecciona del grupo que consiste en los alelos HLA-C*0702, HLA-C*0701 y HLA-C*0704. En una modalidad específica, el alelo HLA es HLA-

C*0702. En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente se modifican genéticamente, se aíslan y/o se purifican.

En algunas modalidades, las proteínas de unión tienen una mayor afinidad de unión al péptido MAGEA1-MHC (pMHC) que un receptor de células T conocido (por ejemplo, un TCR de Kunert *et ál.* (2016) *J. Immunol.* 197:2541-2552 u otros descritos en la presente). Por ejemplo, las proteínas de unión pueden tener al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces, 5000 veces, 10000 veces, 50000 veces, 100000 veces, 500000 veces, 1000000 veces, o más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, por ejemplo, de 1,2 veces a 2 veces, mayor afinidad de unión al péptido MAGEA1-MHC (pMHC) que un receptor de células T conocido.

En algunas modalidades, la proteína de unión induce una mayor expansión de células T, liberación de citocinas y/o aniquilación citotóxica que un receptor de células T conocido cuando se pone en contacto con células diana con expresión de MAGEA1 a un nivel determinado o por debajo (por ejemplo, ver la sección de Ejemplos para líneas celulares representativas que expresan MAGEA1 en diversos niveles). Por ejemplo, en algunas modalidades de cualquier aspecto descrito en la presente, el nivel de MAGEA1 se puede expresar en términos de transcritos por millón y puede ser, por ejemplo, menor o igual a aproximadamente 1000 transcritos por millón de transcritos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM, y 1 TPM, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como menos de o igual a aproximadamente 1,000 TPM a menos de o igual a aproximadamente 73 TPM). Como se describe adicionalmente en la presente, el TPM se mide de acuerdo con técnicas bien conocidas, tal como RNA-Seq,

y los datos de TPM de expresión génica son bien conocidos en la técnica para una variedad de líneas celulares, tipos de tejido y similares (ver, por ejemplo, la Enciclopedia de Línea Celular de Cáncer de Instituto Ampio (CCLE) en la World Wide Web en portals.broadinstitute.org). En alguna modalidad, la proteína de unión induce al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces, o más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como de 1,2 veces a 2 veces, aumento en la expansión de células T, liberación de citocinas, y/o aniquilación citotóxica que un receptor de células T conocido cuando se pone en contacto con células diana con expresión heterocigota de MAGEA1.

En algunas modalidades, la expresión de MAGEA1 se detecta mediante el uso de secuenciación de ARN (RNA-seq). La RNA-seq en general comprende los siguientes pasos: obtener una muestra que contiene material genético, aislar ARN total de la muestra obtenida, preparar una biblioteca de ADNc amplificada a partir del ARN total, secuenciar la biblioteca de ADNc amplificada y analizar y perfilar el ADNc amplificado para evaluar el nivel de expresión de diferentes transcritos. La muestra puede ser una población de células, una muestra de tejido, una muestra de biopsia, un cultivo celular o una célula individual. El ARN total se puede aislar de la muestra biológica usando cualquier método conocido en la técnica. En determinadas modalidades, el ARN total se extrae del plasma. La extracción de ARN plasmático se describe en Enders et ál. "The Concentration of Circulating Corticotropin-Releasing Homer mRNA in Material Plasma Is Inclined in Preclampsia," Clinr. Como se describe allí, el plasma recolectado después del paso de centrifugación se mezcla con el reactivo Trizol LS (Invitrogen) y cloroformo. La mezcla se centrifuga y la capa acuosa se transfiere a un nuevo tubo. Se adiciona etanol a esta capa acuosa. La mezcla se coloca luego en una mini columna RNeasy (Qiagen) y se procesa de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

En algunas modalidades, la RNA-seq descrita en la presente incluye el paso de preparar ADNc amplificado a partir de ARN total. Por ejemplo, se prepara ADNc y la muestra de ARN aislada

se amplifica aleatoriamente sin dilución, o la mezcla de material genético en el ARN aislado se dispersa en muestras de reacción individuales. En determinadas modalidades, la amplificación se inicia aleatoriamente en el extremo 3' y en todo el transcriptoma completo en la muestra para amplificar tanto ARNm como transcritos no poliadenilados. De esta manera, los productos de amplificación de ADNc de doble cadena se optimizan para la generación de bibliotecas de secuenciación para plataformas de secuenciación de próxima generación. Un kit adecuado para la amplificación de ADNc por el método abarcado por la presente invención incluye, por ejemplo, Ovation® RNA-Seq System.

En algunas modalidades, la RNA-seq descrita en la presente incluye el paso de secuenciar el ADNc amplificado. Se puede usar cualquier método de secuenciación conocido para secuenciar la mezcla de ADNc amplificada, incluido el método de secuenciación de molécula individual. En determinadas modalidades, el ADNc amplificado se secuencia mediante secuenciación de escopeta del transcriptoma completo. La secuenciación de escopeta del transcriptoma completo se puede realizar utilizando varias plataformas de secuenciación de próxima generación, tal como la plataforma Illumina® Genome Analyzer, la plataforma ABI SOLiD™ Sequencing o la plataforma 454 Sequencing de Life Science.

En algunas modalidades, la RNA-seq descrita en la presente comprende además realizar recuento y análisis digital en el ADNc. El número de secuencias amplificadas para cada transcrito en la muestra amplificada se puede cuantificar por lectura de secuencia (una lectura por cadena amplificada). En algunas modalidades, el transcrito por millón (TPM) se utiliza para cuantificar el nivel de expresión de un transcrito particular. El TPM se puede calcular como se muestra en Wagner et ál. (2012) Theory in Biosciences 131:281-285, cuyo contenido se incorpora por referencia en la presente en su totalidad.

En determinadas modalidades, las proteínas de unión reconocen un péptido inmunogénico de MAGEA1 en un complejo con moléculas de MHC, tales como moléculas de HLA particulares que tienen alelos de cadena alfa HLA particulares. Por ejemplo, las proteínas de unión enumeradas en la Tabla 2A se identificaron como aglutinantes de péptidos inmunogénicos de MAGEA1 en asociación con un MHC cuya cadena alfa tenía un serotipo HLA-C*07, como el codificado por un alelo HLA-B*0702, HLA-C*0701 y/o HLA-C*0704, como se describe más adelante en la sección de Ejemplos. En algunas modalidades, las proteínas de unión reconocen un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1 y una molécula MHC, donde la

molécula MHC comprende una cadena alfa MHC que es un serotipo HLA seleccionado del grupo que consiste en HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*01, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-C*07, HLA-C*01, HLA-C*02, HLA-C*03, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14, HLA-C*15, HLA-C*16, HLA-C*17 y HLA-C*18, opcionalmente donde el

5 alelo HLA se selecciona del grupo que consiste en HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0212, HLA-A*0213, HLA-A*0214, HLA-A*0216, HLA-A*0217, HLA-A*0219, HLA-A*0220, HLA-A*0222, HLA-A*0224, HLA-A*0230, HLA-A*0242, HLA-A*0253, HLA-A*0260, alelo HLA-A*0274, HLA-A*0301, HLA-A*0302, HLA-A*0305, HLA-A*0307, HLA-A*0101, HLA-A*0102,

10 HLA-A*0103, alelo HLA-A*0116, HLA-A*1101, HLA-A*1102, HLA-A*1103, HLA-A*1104, HLA-A*1105, alelo HLA-A*1119, HLA-A*2402, HLA-A*2403, HLA-A*2405, HLA-A*2407, HLA-A*2408, HLA-A*2410, HLA-A*2414, HLA-A*2417, HLA-A*2420, HLA-A*2422, HLA-A*2425, HLA-A*2426, alelo HLA-A*2458, HLA-B*0702, HLA-B*0704, HLA-B*0705, HLA-B*0709, HLA-B*0710, HLA-B*0715, HLA-B*0721, HLA-C*0702, HLA-C*0701, HLA-C*0401, HLA-C*0602,

15 HLA-C*0304, HLA-C*0501, HLA-C*1601, HLA-C*0202, HLA-C*0303, HLA-C*1203, HLA-C*0802, HLA-C*0102, HLA-C*1701, HLA-C*1502, HLA-C*1402, HLA-C*1202, HLA-C*0704, HLA-C*0801, HLA-C*0302, HLA-C*1801, HLA-C*1505, HLA-C*1602, HLA-C*0804, HLA-C*0305 y alelo HLA-C*1403. En algunas modalidades, los péptidos inmunogénicos de MAGEA1 derivan de una proteína MAGEA1 humana y/o una proteína MAGEA1 que se

20 muestra en la Tabla 3. En algunas modalidades, uno o más péptidos inmunogénicos de MAGEA1 se administran solos o junto con un adyuvante.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia de

25 cadena alfa de TCR con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad con una secuencia de cadena alfa de TCR seleccionada del grupo que consiste en las

secuencias alfa de TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de cadena beta de TCR con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad con una

30 secuencia de cadena beta de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de cadena beta de TCR enumeradas en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia de cadena alfa de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de cadena alfa de TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de cadena beta de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de cadena beta de TCR enumeradas en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia de dominio variable de cadena alfa de TCR (V_α) con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una secuencia de dominio variable (V_α) de cadena alfa del TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_α del TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de dominio variable (V_β) de cadena beta del TCR con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más identidad con una secuencia de dominio variable (V_β) de cadena beta de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_β de TCR enumeradas en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en): a) una secuencia de dominio variable (V_α) de cadena alfa de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_α de TCR enumeradas en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de dominio variable (V_β) de cadena beta de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominio V_β de TCR enumeradas en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en al menos una (por ejemplo, una, dos o tres, tal como CDR3 sola o en combinación con una CDR1 y CDR2)) secuencia de región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa de TCR con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una secuencia de CDR de cadena alfa de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de cadena alfa de TCR enumeradas en la Tabla 2. Se cree que CDR3 es la CDR principal responsable de reconocer el antígeno procesado y CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC, por

lo que, en algunas modalidades, se proporciona una proteína de unión que comprende una CDR3 sola de una cadena alfa de TCR y/o una CDR3 sola de una cadena beta de TCR enumerada en la Tabla 2, cada CDR3 tiene una homología de secuencia como se menciona en este párrafo.

- 5 En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente también pueden incluir (por ejemplo, comprender, consistir esencialmente en o consistir en al menos una (por ejemplo, una, dos o tres, tal como CDR3 sola o en combinación con una CDR1 y CDR2)) secuencia de región determinante de complementariedad (CDR) de cadena beta de TCR con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,
10 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una secuencia de CDR de cadena beta de TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de cadena beta de TCR enumeradas en la Tabla 2. Como se describió anteriormente, se cree que CDR3 es la CDR principal responsable de reconocer el antígeno procesado y CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC, por lo que, en algunas modalidades, se
15 proporcionan proteínas de unión que comprenden una CDR3 sola de una cadena beta de TCR y/o una CDR3 sola de una cadena alfa de TCR enumerada en la Tabla 2, cada CDR3 tiene una homología de secuencia como se menciona en este párrafo.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en al menos una (por ejemplo, una, dos o tres)) región determinante de complementariedad (CDR) de cadena alfa de TCR
20 enumerada en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente también pueden incluir (por ejemplo, comprender, consistir esencialmente en o consistir en al menos una (por ejemplo, una, dos o tres)) región determinante de complementariedad (CDR) de
25 cadena beta de TCR enumerada en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de región constante de cadena alfa de TCR ($C\alpha$) con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o
30 más identidad con una secuencia $C\alpha$ de TCR enumerada en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente también

pueden incluir (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de región constante de cadena beta de TCR (C_β) con al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una secuencia C_β de TCR enumerada en la Tabla

5 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de región constante de cadena alfa de TCR (C_α) seleccionada del grupo que consiste en las secuencias C_α de TCR enumeradas en la Tabla 2.

10 En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente también pueden incluir (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de región constante de cadena beta de TCR (C_β) seleccionada del grupo que consiste en las secuencias C_β de TCR enumeradas en la Tabla 2.

15 **Tabla 2: Secuencias de TCR que reconocen un antígeno de MAGEA1**

Tabla 2A

Secuencias de TCR que reconocen un antígeno de MAGEA1 presentado por el serotipo HLA HLA-C*07

20

Secuencia de tipo silvestre de MAGEA1 TCR 32-39

Cadena alfa:

TRAV29-DV5/TRAJ43/TRAC

25 Secuencia de ADN de cadena alfa

ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGGGGTTAA
 CAGTCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTCC
 AGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACT **AACAGCATGTTTGATTATTTCT**
 TTGGTACAAGAAATACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCCTGATTTCT **ATTAGTTCCATTAA**
 30 **GGATAAAA**AATGAAGATGGAAGATTCACTGTTTTCTTAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTC
 TCTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGTACTTCT **TGTGCAGCAAGCG**

CTCAGAACAATGACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAGACTGACAGTTAAACCAAatatcca
 gaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaaca
 aatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagt
 gctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagc
 5 ccagaaagttcctgtgatgtcaagctggctcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgg
 gttccgaatcctcctcctgaaagtgccgggtttaatctgctcatgacgctgcggctgtgggtccagc

Secuencia de proteína de cadena alfa

MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYT**NSMFDY**FLW
 10 YKKYPAEGPTFLIS**ISSIKDK**NEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYF**CAASAQNND**
MREGAGTRLTVKPNiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfsqtinvvsqskdsdvyitdktlvdmrsmdfksnsavawsn
 ksdfacanafnnsiipedtffpspesscdvklveksfetdtnlnfnqlsvigfrilllkvagnllmtrlwss

Cadena beta:

15 TRBV18/TRBJ2-7/TRBC1

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGACACCAGACTTCTCTGCTGTGCTGTCATCTGTCTCCTGGGGGCAGGCCTCTCAA
 TGCCGGCGTCATGCAGAACCCAAGACACCTGGTCAGGAGGAGGGGACAGGAGGCAAG
 20 ACTGAGATGCAGCCCAATG**AAAGGACACAGTCAT**GTTTACTGGTATCGGCAGCTCCCA
 GAGGAAGGTCTGAAATTCATGGTTTAT**CTCCAGAAAGAAAATATC**ATTGATGAGTCAGG
 AATGCCAAAGGAACGCTTTTCTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCCCCAGCATCCTGAGGA
 TCCAGCAGGTTGTGCGCGGAGATTCTGCAGCTTATTTCT**TGTGCCAGCTCACCTCCTAC**
GAGCAGTACTTCGGGCCTGGCACCAGGCTCACTGTCACAGaggacctgaacaaggtgttcccacc
 25 gaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttctcc
 ctgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggacccgcagcccctcaagga
 gcagcccgccctcaatgactccagatactgcctgagcagccgcctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgcaacca
 cttccgctgtcaagtccagttctacgggtctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtc
 agcgccgaggcctggggtagagcagactgtggctttacctcgggtgtcctaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatga
 30 gatcctgctaggggaaggccaccctgtatgtgtgtgtgcagcgccctgtgttgatggccatggtcaagagaaaggatttc

Secuencia de proteína de cadena beta

MDTRLLCCAVICLLGAGLSNAGVMQNPRHLVRRRGQEARLRCSPMKGHSHVYWYRQLPEE
 GLKFMVYLOKENIIDESGMPKERFSAEFPKEGPSILRIQQVVRGDSAAYFCASSPSYEQYFG
 PGTRLTVTEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstdpqplkeqpalsryc
 5 lssrlrvsatfwqnpnrnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlisatilyeillgkatlyavlvsal
 vlmamvkrkdf

Secuencia de tipo silvestre de MAGEA1 TCR 32-41

10 Cadena alfa:

TRAV27/TRAJ52/TRAC

Secuencia de ADN de cadena alfa

ATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTCCATTCTTTGGATTTCAGTTGGCATGGGTGAGCACCCAG
 15 CTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGTTTCTTAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACTGTGTA
 CTGCAACTCCTCAAGTGTTTTCTCCAGCCTTCAATGGTACAGACAGGAGCCTGGGGAAG
 GTCCTGTCCTCCTGGTGACAGTTGTTACTGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGACTT
 ACCTTTCAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAGCCCAGCCT
 GGTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCAGGAGATGAAAGTATTAGCTATGGAAAGCTGA
 20 CATTTGGACAAGGGACCATCTTGACTGTCCATCCAAatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagct
 gagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaatgtgtcacaaagtaaggattctgatg
 tgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctga
 ctttgcattgtgcaaacgcctcaacaacagcattattccagaagacaccttctccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctg
 gtcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaacttcaaaacctgtcagtgattgggtccgaatcctcctcctgaaagtggcc
 25 gggtttaatctgctcatgacgctgcggctgtgtgtccagc

Secuencia de proteína de cadena alfa

MVLKFSVSILWIQLAWVSTQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPV
 LLVTVVTGGEVKKLKRLLTFQFGDARKDSSLHITAAQPGDTGLYLCAGDESISYGKLTFGQGQTI
 30 LTVHPNi qnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvitdktvldmrsmdfksnsavawsnkdsfacanafn
 nsiipedtffpspesscdvklveksfetdnlfnqnlsvigfrilllkvagfnllmtlrlwss

Cadena beta:

TRBV12-4/TRBJ1-4/TRBC1

5 Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGGCTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTTGCATCCTGGTTGCAAAGCACACAGA
 TGCTGGAGTTATCCAGTCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAAGTGACT
 CTGAGATGTAAACCAATT**TCAGGACATGACTAC**CTTTTCTGGTACAGACAGACCATGATG
 CGGGGACTGGAGTTGCTCATTAC**TTTAACAACAACGTTCTCT**ATTGATGATTCAGGGAT
 10 GCCCGAGGATCGCTTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTCCACTCTGAAGATCCA
 GCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCT**TGTGCCAGCAGTTTTCTCGGCTGGA**
ATGAAAACTGTTCTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGGaggacctgaacaaggtgttc
 ccacccgaggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggc
 ttcttcctgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggacccgcagcccctc
 15 aaggagcagccccccctcaatgactccagatactgcctgagcagccgcctgagggctcggccaccttctggcagaacccccgc
 aaccactccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggacccaggatagggccaaacccgtcaccag
 atcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagactgtggctttacctcgggtgcctaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctc
 tatgagatcctgctaggggaaggccaccctgtatgtgtgtgctggtcagcgccctgtgtgatggccatggtcaagagaaaggatttc

20 Secuencia de proteína de cadena beta

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI**SGHDY**LFWYRQTMMRG
 LELLIY**FNNNVP**IDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**CASSFLGWNEKLF**
EGSGTQLSVLEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstpqplkeqpalnds
 ryclssrlrvsatfwqnpnrnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlsatilyeillgkatlyavlv
 25 salvlmamvkrkdf

Secuencia optimizada por codones de MAGEA1 TCR 32-39 HM

Cadena alfa:

30 TRAV29-DV5/TRAJ43/TRAC de ratón optimizado por codones

Secuencia de ADN de cadena alfa

ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGGGGTTAA
 CAGTCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTCC
 AGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACT **AACAGCATGTTTGATTATTTCT**
 5 TTGGTACAAGAAATACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCCTGATTTCT **ATTAGTTCCATTAA**
GGATAAAAAATGAAGATGGAAGATTCACTGTTTTCTTAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTC
 TCTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGTACTTCT **TGTGCAGCAAGCG**
CTCAGAACAATGACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAGACTGACAGTTAAACCAAcattca
 aaaccagaacccgccgtctaccagctgaaagacccgaggtctcaagactctacgttgctgttcaccgatttcgacagtcaga
 10 taaatgtgcctaagaccatggagagtggcactttcatcactgacaaatgtgtgttgacatgaaggctatggacagcaagtcaaac
 ggcgcgattgcttggtccaacaaacttcttcacgtgccaggacatcttaaggagacaaacgccacctatccatcctctgatgttc
 cgtgcgatgcgactcttaccgagaaaagcttcgagacggacatgaactgaactccaaaacctgctgtgatggtactgcgaata
 cttcttctaaggtggcgggcttcaatttgctcatgacactcagactttggtctagc

15 Secuencia de proteína de cadena alfa

MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYT **NSMFDY**FLW
 YKKYPAEGPTFLIS **ISSIKDK**NEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYF **CAASAQNND**
MRFGAGTRLTVKPNiqnpepavyqlkdp rsqdstlclftdfdsqinvpktmesgtfitdkcvldmkamdsksngaiawsn
 qtsftcqdifketnatypssdvpcdatlteksfetdmnlfnqnlvmvlrllllkvagfnllmtlrlwss

20

Cadena beta:

TRBV18/TRBJ2-7/TRBC de ratón optimizado por codones

Secuencia de ADN de cadena beta

25 ATGGACACCAGACTTCTCTGCTGTGCTGTCATCTGTCTCCTGGGGGCAGGCCTCTCAA
 TGCCGGCGTCATGCAGAACCCAAGACACCTGGTCAGGAGGAGGGGACAGGAGGCAAG
 ACTGAGATGCAGCCCAATG **AAAGGACACAGTCAT**GTTTACTGGTATCGGCAGCTCCCA
 GAGGAAGGTCTGAAATTCATGGTTTAT **CTCCAGAAAGAAAATATC**ATTGATGAGTCAGG
 AATGCCAAAGGAACGCTTTTCTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCCCCAGCATCCTGAGGA
 30 TCCAGCAGGTTGTGCGCGGAGATTCTGCAGCTTATTTCT **TGTGCCAGCTCACCTCCTAC**
GAGCAGTACTTCGGGCCTGGCACCAGGCTCACTGTCACAGaagatcttcgaaacgtaacccctcca

aaagtgagtctctttgaaccgagtaaggctgagatcgcgaaacaaacaaaaggcgaccctcgtctgtcttgcgcgaggatttttccc
 gaccacgtggagttgtcttgggtgggtaaaccgtaaggaagtacacagcggtgtttgcaccgaccctcaagcctacaaggaatcta
 actattcatactgcctttcatcccgacttagggtttctgtaccttttggcacaatccgaggaatcacttttaggtgtcaagtacagttccac
 ggattgtcagaggaggataaatggccggaggggtccccgaagccggttacgcagaacattagtgcggaagcctggggacgag
 5 cagactgcggtatcacgtctgccagctatcagcaaggcgttctgtcagcgacaattctgtacgaaatacttttgggtaaggctacatt
 gtatgcggtattggtgtctacgtggtagtcatggccatggtgaaacgaaaaaactca

Secuencia de proteína de cadena beta

MDTRLLCCAVICLLGAGLSNAGVMQNPRHLVRRRGQEARLRCSPMKGHSHVYWYRQLPEE
 10 GLKFMVYLOKENIIDESGMPKERFSAEFPKEGPSILRIQQVVRGDSAAYFCASSPSYEQYFG
 PGTRLTVTEdlrlnvtpkvsfepskaeiankqkatlvclargffpdhvelswwwngkevhsgvctdpqaykesnysyclssrl
 rvsatfwhnprnhfrcqvqfhglseedkwpegsppkvtqnisaewgradcgitsasyqqgvlstilyeillgkatlyavlvstlvvm
 amvkrkns

- 15 Secuencia de ADN ORF beta y alfa completa (La región en cursiva subrayada en el sitio de
 «Furina-P2A» codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas
 en un único casete)

ATGGACACCAGACTTCTCTGCTGTGCTGTCATCTGTCTCCTGGGGGCAGGCCTCTCAA
 TGCCGGCGTCATGCAGAACCCAAGACACCTGGTCAGGAGGAGGGGACAGGAGGCAAG
 20 ACTGAGATGCAGCCCAATGAAAGGACACAGTCATGTTTACTGGTATCGGCAGCTCCCA
 GAGGAAGGTCTGAAATTCATGGTTTATCTCCAGAAAGAAAATATCATTGATGAGTCAGG
 AATGCCAAAGGAACGCTTTTCTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCCCCAGCATCCTGAGGA
 TCCAGCAGGTTGTGCGCGGAGATTCTGCAGCTTATTTCTTGTGCCAGCTCACCCCTCCTAC
GAGCAGTACTTCGGGCCTGGCACCAAGGCTCACTGTCACAGaagatcttcgaaacgtaaccctcca
 25 aaagtgagtctctttgaaccgagtaaggctgagatcgcgaaacaaacaaaaggcgaccctcgtctgtcttgcgcgaggatttttccc
 gaccacgtggagttgtcttgggtgggtaaaccgtaaggaagtacacagcggtgtttgcaccgaccctcaagcctacaaggaatcta
 actattcatactgcctttcatcccgacttagggtttctgtaccttttggcacaatccgaggaatcacttttaggtgtcaagtacagttccac
 ggattgtcagaggaggataaatggccggaggggtccccgaagccggttacgcagaacattagtgcggaagcctggggacgag
 cagactgcggtatcacgtctgccagctatcagcaaggcgttctgtcagcgacaattctgtacgaaatacttttgggtaaggctacatt
 30 gtatgcggtattggtgtctacgtggtagtcatggccatggtgaaacgaaaaaactcaAGAGCCAAAAGAAGCGGGA
GCGGTGCGACAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGG

ACCTATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGGG
TTAACAGTCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCG
TCCAGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACTAACAGCATGTTTGATTATTT
CCTTTGGTACAAGAAATACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCCTGATTTCTATTAGTTCATT
5 AAGGATAAAAATGAAGATGGAAGATTCAGTGTTCCTTAACAAAAGTGCCAAGCACCTC
TCTCTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGTACTTCTTGTGCAGCAAG
CGCTCAGAACAAATGACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAGACTGACAGTTAAACCAAcacat
tcaaaacccagaacccgccgtctaccagctgaaagacccgaggtctcaagactctacgttgctgttcaccgatttcgacagtca
gataaatgtgcctaagaccatggagagtggcactttcatcactgacaaatgtgtgttgacatgaaggctatggacagcaagtcaa
10 acggcgcgattgcttggtccaaccaaacttcttcacgtgccaggacatcttcaaggagacaaacgccacctatccatcctctgatgt
tccgtgcatgacgactctaccgagaaaagcttcgagacggacatgaactgaactccaaaacctgctgtgatggtactgcgaat
acttcttctaaggtggcggttcaattgctcatgacactcagactttggtctagc

Secuencia de proteína ORF beta y alfa completa (La región en cursiva subrayada en el sitio
15 de «Furina-P2A» permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un único casete)
MDTRLLCCAVICLLGAGLSNAGVMQNPRHLVRRRGQEARLRCSPMKGHSHVYWYRQLPEE
GLKFMVYLOKENIIDESGMPKERFSAEFPKEGPSILRIQQVVRGDSAAYFCASSPSYEQYFG
PGTRLTVTEdlrinvtppkvslfepskaeiankqkatlvclargffpdhvelswwwngkevhsgvctdpqaykesnysyclsr
rvsatfwhnprnhfrcqvfhlseedkwpegsppkvtqnisaeeawgradcgitsasyqqgvlstilyeillgkatlyavlvstlv
20 amvkrknsRAKRSGSGATNFSLLQAGDVEENPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDD
QQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSSIKDKNEDGRFTV
FLNKSARKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASAQNNDMRFGAGTRLTVKPNiqnpepavyqlkdprrsqd
stlclftdfdsqinvpktmesgtfitdkcvldmkamdsksngaiawsnqtsftcqdifketnatypssdvpcdatlteksfetdmnlnf
qnlvmvrlrlllkvagfnllmtlrlwss

25

Secuencia híbrida humana/ratón (HM) de MAGEA1 TCR 32-41 (mismas CDR que
«MAGEA1 TCR32-41 MGTM». En algunas modalidades, las secuencias de ADN de cadena
alfa y cadena beta optimizada por codones del TCR se pueden usar como se muestra en un
30 vector proporcionado en la Tabla 3, tal como el vector pNVVD142.)

Cadena alfa:

TRAV27/TRAJ52/TRAC de ratón optimizado por codones

Secuencia de ADN de cadena alfa

5 ATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTCCATTCTTTGGATTTCAGTTGGCATGGGTGAGCACCCAG
 CTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGTTTCTTAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACTGTGTA
 CTGCAACTCCTCAAGTGTTTTCTCCAGCCTTCAATGGTACAGACAGGAGCCTGGGGAAG
 GTCCTGTCCTCCTGGTGACAGTTGTTACTGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGACTT
 ACCTTTCAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAGCCCAGCCT
 10 GGTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCAGGAGATGAAAGTATTAGCTATGGAAAGCTGA
CATTTGGACAAGGGACCATCTTGACTGTCCATCCAAacattcaaaaccagaacccgccgtctaccagc
 tgaaagacccgaggtctcaagactctacgttgctgtgtaccgatttcgacagtcagataaatgtgcctaagaccatggagagt
 gcactttcatcactgacaaatgtgtgttgacatgaaggctatggacagcaagtcaaacggcgcgattgcttggtccaacaaact
 ctttcacgtgccaggacatctcaaggagacaaacgccacctatccatcctctgatgtccgtgcgatgcgactcttaccgagaaaa
 15 gcttcgagacggacatgaactgaacttccaaaacctgcttgatggtactgccaatacttcttctaaggtggcgggcttcaattgc
 tcatgacactcagactttggtctagc

Secuencia de proteína de cadena alfa

MVLKFSVSILWIQLAWVSTQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLLQWYRQEPGEGPV
 20 LLVTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDARKDSSLHITAAQPGDTGLYLCAGDESISYGKLTFGQGTI
 LTVHPNiqnpepavyqlkdprsqdstlclftdfdsqinvpktmesgtfjdkcvldmkamdsksngaiawsnqtsftcqdfketn
 atypssdvpdatlteksfetdmnlfnqnlvmvlrllllkvagfnllmtlrlwss

Cadena beta:

25 TRBV12-4/TRBJ1-4/TRBC de ratón optimizado por codones

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGGCTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTTGCATCCTGGTTGCAAAGCACACAGA
 TGCTGGAGTTATCCAGTCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAAGTGACT
 30 CTGAGATGTAAACCAATTTCAGGACATGACTACCTTTTCTGGTACAGACAGACCATGATG
 CGGGGACTGGAGTTGCTCATTACTTTAACAACAACGTTCTCTATTGATGATTCAGGGAT

GCCCGAGGATCGCTTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTCCACTCTGAAGATCCA
 GCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTTGTGCCAGCAGTTTTCTCGGCTGGA
ATGAAAACTGTTCTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGaagatcttcgaaacgtaacc
 cctccaaaagttagtctctttgaaccgagtaaggctgagatcggaacaaacaaaaggcgaccctcgctgtcttgcgaggat
 5 ttttcccgaccacgtggagttgtcttggtgggtaaacggtaaggaagtacacagcggtgtttgcaccgaccctcaagcctacaagg
 aatctaactattcatactgcctttcatcccacttagggtttctgctaccttttggcacaatccgaggaatcacttttaggtgtcaagtacag
 ttccacggattgtcagaggaggataaatggccggaggggtccccgaagccggttacgcagaacattagtgcggaagcctgggg
 acgagcagactgcggtatcacgtctgccagctatcagcaaggcggttctgtcagcgacaattctgtacgaaatactttgggtaaggc
 tacattgtatgcggtattggtgtctacgctggttagtcatggccatggtgaaacgaaaaaactca

10

Secuencia de proteína de cadena beta

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRG
 LELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFLGWNEKLF
EGSGTQLSVLEdlnvtpkvsIfepskaeiankqkatlvclargffpdhvelswwwngkevhsqvctdpqaykesnysycl
 15 ssrlrvsatfwhnprnhfrcqvfqfhlseedkwpegsppkvtqnisaewgradcgitsasyqqgvlstilyeillgkatlyavlvstl
 vvmamvkrkns

Secuencia de ADN ORF beta y alfa completa (La región en cursiva subrayada en el sitio de
 «Furina-P2A» codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas
 20 en un único casete)

ATGGGCTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTTGCATCCTGGTTGCAAAGCACACAGA
 TGCTGGAGTTATCCAGTCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAAGTGACT
 CTGAGATGTAAACCAATTTCAGGACATGACTACCTTTTCTGGTACAGACAGACCATGATG
 CGGGGACTGGAGTTGCTCATTACTTTAACAACAACGTTTCCTATTGATGATTCAGGGAT
 25 GCCCGAGGATCGCTTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTCCACTCTGAAGATCCA
 GCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTTGTGCCAGCAGTTTTCTCGGCTGGA
ATGAAAACTGTTCTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGaagatcttcgaaacgtaacc
 cctccaaaagttagtctctttgaaccgagtaaggctgagatcggaacaaacaaaaggcgaccctcgctgtcttgcgaggat
 ttttcccgaccacgtggagttgtcttggtgggtaaacggtaaggaagtacacagcggtgtttgcaccgaccctcaagcctacaagg
 30 aatctaactattcatactgcctttcatcccacttagggtttctgctaccttttggcacaatccgaggaatcacttttaggtgtcaagtacag
 ttccacggattgtcagaggaggataaatggccggaggggtccccgaagccggttacgcagaacattagtgcggaagcctgggg

acgagcagactgcggtatcacgtctgccagctatcagcaaggcgttctgtcagcgacaattctgtacgaaatactttgggtaaggc
 tacattgtatgcggtattggtgtctacgtggttagtcatggccatggtgaaacgaaaaaactcaAGAGCCAAAAGAAGCG
GGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCC
CGGACCTATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTCCATTCTTTGGATTGAGTTGGCATGGGTGAG
 5 CACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGTTTCTTAGCATCCAAGAGGGAGAAAAATCTCA
 CTGTGTACTGCAACTCCTCAAGTGTTTTCTCCAGCCTTCAATGGTACAGACAGGAGCCT
 GGGGAAGGTCCTGTCCTCCTGGTGACAGTTGTTACTGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGA
 AGAGACTTACCTTTAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAG
 CCCAGCCTGGTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCGAGGAGATGAAAGTATTAGCTATGG
 10 AAAGCTGACATTTGGACAAGGGACCATCTTGACTGTCCATCCAAacattcaaaaccagaacccg
 ccgtctaccagctgaaagacccgaggtctcaagactctacgttgtgtgttaccgatttcgacagtcagataaatgtgcctaagac
 catggagagtggcactttcatcactgacaaatgtgtgttgacatgaaggctatggacagcaagtcaaacggcgcgattgcttgt
 ccaaccaaactctttcacgtgccaggacatctcaaggagacaaacgccacctatccatcctctgatgttccgtgcatgcatgactct
 taccgagaaaagcttcgagacggacatgaactgaactccaaaacctgcttgatggtactgcaataacttcttctaaggtggcg
 15 ggcttcaattgctcatgacactcagactttggtctagc

Secuencia de proteína ORF beta y alfa completa (La región en cursiva subrayada en el sitio de «Furina-P2A» permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un único casete)

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRG
 20 LELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSFLGWNEKLF
EGSGTQLSVLEdlnvtpkvsIfepskaeiankqkatlvclargffpdhvelswwwngkevhsqvctdpqaykesnysycl
 ssrlrvsatfwhnprnhfrcqvqfhglseedkwpegsppkvtqnisaewgradcgitsasyqqgvlstilyeillgkatlyavlvstl
 vvmamvkrknsRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVLKFSVSILWIQLAWVSTQLLEQS
 PQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLLVTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDA
 25 RKDSSLHITAAQPGDTGLYLCAGDESISYGKLTFGQGTILTVHPNiqnpepavyqlkdpdsqdstlclftdf
 dsqinvpktmesgtfiddkcvldmkamdsksngaiawsnqtsftcqdfketnatypssdvpcdatlteksfetdmnlfnqnlvmv
 lrillkvagfnllmtlrlwss

Nota: Las secuencias CDR1 y CDR2 para cada clon a continuación son redundantes para el
 30 nombre de clon de base correspondiente enumerado anteriormente

Secuencia optimizada por codones de MAGEA1 TCR 32-39 MGTM

Cadena alfa:

TRAV29-DV5/TRAJ43/TRAC modificado por MGTM

5 Secuencia de ADN de cadena alfa

ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGGGTAA
 CAGTCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTCC
 AGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACT **AACAGCATGTTTGATTAT**TTTCCT
 TTGGTACAAGAAATACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCCTGATTTCT **ATTAGTTCCATTAA**
 10 **GGATAAAA**AATGAAGATGGAAGATTCACTGTTTTCTTAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTC
 TCTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGTA CT**TGTGCAGCAAGCG**
CTCAGAACAATGACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAGACTGACAGTTAAACCAaacaatcca
 gaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagcca
 gaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaag
 15 agcaacagcgccgtggcctggccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttaacaacagcatcatccccgaggaca
 ccttctccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggaggagaagtcctcgagacagacaccaatctgaacttccagaa
 cctgctggtgatcgctgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagc

Secuencia de proteína de cadena alfa

20 MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYT**NSMFDY**FLW
 YKKYPAEGPTFLIS**ISSIKDK**NEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYF**CAASAQNND**
MREFGAGTRLTVKPNiqnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdkvtldmrsmdfksnsavawsn
 ksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnlvivlrlillkvagfnllmtlrlws

25 Cadena beta:

TRBV18/TRBJ2-7/ TRBC1 modificado por MGTM

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGACACCAGACTTCTCTGCTGTGCTGTCATCTGTCTCCTGGGGGCAGGCCTCTCAA
 TGCCGGCGTCATGCAGAACCCAAGACACCTGGTCAGGAGGAGGGGACAGGAGGCAAG
 30 ACTGAGATGCAGCCCAATG**AAAGGACACAGTCAT**GTTTACTGGTATCGGCAGCTCCCA
 GAGGAAGGTCTGAAATTCATGGTTTAT**CTCCAGAAAGAAAATATC**ATTGATGAGTCAGG

AATGCCAAAGGAACGCTTTTCTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCCCCAGCATCCTGAGGA
 TCCAGCAGGTTGTGCGCGGAGATTCTGCAGCTTATTTCTTGTGCCAGCTCACCTCCTAC
GAGCAGTACTTCGGGCCTGGCACCAGGCTCACTGTCACAgaagatctgaacaaggtgttcctccag
 aggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgctggccaccggcttttcccc
 5 gaccacgtggaactgtcttgggtgggtcaacggcaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaaca
 gcctgccctgaacgacagccggtactgctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttc
 agatgccaggtgcagtttacggcctgagcgagaacgacgagtggaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgt
 ctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgctcctatcaccagggcggtgctgagcgccacaatcctgtacg
 aaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctgggtgtctgctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggacttt

10

Secuencia de proteína de cadena beta

MDTRLLCCAVICLLGAGLSNAGVMQNPRHLVRRRGQEARLRCSPMKGHSHVYWYRQLPEE
 GLKFMVYLQKENIIDESGMPKERFSAEFPKEGPSILRIQQVVRGDSAAYFCASSPSYEQYFG
 PGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsqvstdpqpkeqpalndsryc
 15 lssrlrvsatfwqnrnhfrqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsal
 vlmamvkrkdf

Secuencia de ADN ORF beta y alfa completa

ATGGACACCAGACTTCTCTGCTGTGCTGTCATCTGTCTCCTGGGGGCAGGCCTCTCAA
 20 TGCCGGCGTCATGCAGAACCCAAGACACCTGGTCAGGAGGAGGGGACAGGAGGCAAG
 ACTGAGATGCAGCCCAATGAAAGGACACAGTCATGTTTACTGGTATCGGCAGCTCCCA
 GAGGAAGGTCTGAAATTCATGGTTTATCTCCAGAAAGAAAATATCATTGATGAGTCAGG
 AATGCCAAAGGAACGCTTTTCTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCCCCAGCATCCTGAGGA
 TCCAGCAGGTTGTGCGCGGAGATTCTGCAGCTTATTTCTTGTGCCAGCTCACCTCCTAC
 25 GAGCAGTACTTCGGGCCTGGCACCAGGCTCACTGTCACAgaagatctgaacaaggtgttcctccag
 aggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgctggccaccggcttttcccc
 gaccacgtggaactgtcttgggtgggtcaacggcaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaaca
 gcctgccctgaacgacagccggtactgctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttc
 agatgccaggtgcagtttacggcctgagcgagaacgacgagtggaccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgt
 30 ctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgctcctatcaccagggcggtgctgagcgccacaatcctgtacg
 aaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctgggtgtctgctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttGG

CAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAA
 GCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGC
 TGATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAAGAATGATGACCAGCAA
 GTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAGGAAGGAAGAAATTTCTATTCTGAACTGT
 5 GACTATACTAACAGCATGTTTGATTATTTTCCTTTGGTACAAGAAATACCCTGCTGAAGGT
 CCTACATTCCTGATTTCTATTAGTTCATTAAAGGATAAAAAATGAAGATGGAAGATTCACT
 GTTTTCCTTAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTCTCTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGA
 GACTCTGCAGTGTACTTCTTGTGCAGCAAGCGCTCAGAACAATGACATGCGCTTTGGAG
 CAGGGACCAGACTGACAGTTAAACCAaacaatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactcca
 10 agtccagcgacaagagcggtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctac
 ataacggataagaccgtgtggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctgggtccaacaagagcgactt
 cgctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccaggacaccttctccccagcagcgacgtgcctgcgacgtgaaact
 ggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgtgtggtatcggtgctgcggattctgctgctgaaagtggc
 cggttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagc

15

Secuencia de proteína ORF beta y alfa completa

MDTRLLCCAVICLLGAGLSNAGVMQNPRHLVRRRGQEARLRCSPMKGHSHVYWYRQLPEE
 GLKFMVYLKENIIDESGMPKERFSAEFPKEGPSILRIQQVVRGDSAAYFCASSPSYEQYFG
 PGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstdpqpplkeqpalsryc
 20 lssrlrvsatfwqnrnhfrqvfqylsendewtqdrakpvtqivsaewgradcgitsasyhggvlsatilyeillgkatlyavlvsal
 vlmamvkrkdfGSGRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQ
 QKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNED
 GRFTVFLNKSARKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASAQNNDMRFGAGTRLTVKPNiqnppdpavyqlr
 dskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdyitdkvtldmrsmdfksnsavawsnsksdfacanafnnsiipedtffpsdvpdcvkl
 25 veksfetdtnlnfqnlvivlrillkvagfnllmtlrlws

Secuencia optimizada por codones MGTM de MAGEA1 TCR 32-41 (también denominada
 «TCR41» o «41» o «TCR-204-C07». En algunas modalidades, las secuencias de ADN de
 30 cadena alfa y cadena beta optimizada por codones del TCR se pueden usar como se muestra
 en un vector proporcionado en la Tabla 3, tal como el vector pNVVD142.)

Cadena alfa:

TRAV27/TRAJ52/TRAC modificado por MGTM

Secuencia de ADN de cadena alfa

5 ATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTCCATTCTTTGGATTTCAGTTGGCATGGGTGAGCACCCAG
 CTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGTTTCTTAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACTGTGTA
 CTGCAACTCCTCAAGTGTTTTCTCCAGCCTTCAATGGTACAGACAGGAGCCTGGGGAAG
 GTCCTGTCCTCCTGGTGACAGTTGTTACTGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGACTT
 ACCTTTCAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAGCCCAGCCT
 10 GGTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCAGGAGATGAAAGTATTAGCTATGGAAAGCTGA
CATTTGGACAAGGGACCATCTTGACTGTCCATCCAaacatccagaacccccgaccccgccgtgtaccagc
 tgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggac
 agcgacgtctacataacggataagaccgtgtgtgacatgaggagcatggactcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaa
 caagagcgacttcgctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcagcgacgtgccctg
 15 cgacgtgaaactggtggagaagtccctcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgctgctgcggattctgct
 gctgaaagtggccggttcaatctgctgatgacctgcggctgtggagc

Secuencia de proteína de cadena alfa

MVLKFSVSILWIQLAWVSTQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLLQWYRQEPGEGPV
 20 LLVTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDARKDSSLHITAAQPGDTGLYLCAGDESISYGKLTFGQGTI
 LTVHPNi qnpdpavyqlrdsksdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvitdktvldmrsmdfksnsavawsnkdsfacanafn
 nsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnlvlvllrlllkvagfnllmtrlrws

Cadena beta:

25 TRBV12-4/TRBJ1-4/ TRBC1 modificado por MGTM

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGGCTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTTGCATCCTGGTTGCAAAGCACACAGA
 TGCTGGAGTTATCCAGTCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAAGTGACT
 CTGAGATGTAAACCAATTTCAGGACATGACTACCTTTTCTGGTACAGACAGACCATGATG
 30 CGGGGACTGGAGTTGCTCATTACTTTAACAACAACGTTCTATTGATGATTACAGGGAT
 GCCCGAGGATCGCTTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTCCACTCTGAAGATCCA

GCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCT**TGTGCCAGCAGTTTTCTCGGCTGGA**
ATGAAAACTGTTCTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGgaagatctgaacaaggtgtcc
ctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctt
ttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaa
5 gaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaa
ccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaa
atcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgtgagcgccacaatc
ctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgtggtgtctgctctggtgtgatggccatggtcaagcggaagga
cttt

10

Secuencia de proteína de cadena beta

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI**SGHDY**LFWYRQTMMRG
LELLIY**FNNNVP**IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**CASSFLGWNEKLF**
EGSGTQLSVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstdpqplkeqpals
15 ryclssrlrvsatfwqnpnrnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqqvlsatilyeillgkatlyavlv
salvlmamvkrkdf

Secuencia de ADN ORF beta y alfa completa

ATGGGCTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTTGCATCCTGGTTGCAAAGCACACAGA
20 TGCTGGAGTTATCCAGTCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAAGTGACT
CTGAGATGTAAACCAATT**TCAGGACATGACTAC**CTTTTCTGGTACAGACAGACCATGATG
CGGGGACTGGAGTTGCTCATTAC**TTTAACAACAACGTTCTCT**ATTGATGATTCAGGGAT
GCCCGAGGATCGCTTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTCCACTCTGAAGATCCA
GCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCT**TGTGCCAGCAGTTTTCTCGGCTGGA**
25 **ATGAAAACTGTTCTTT**GGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGgaagatctgaacaaggtgtcc
ctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctt
ttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaa
gaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaa
ccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaa
30 atcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgtgagcgccacaatc
ctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgtggtgtctgctctggtgtgatggccatggtcaagcggaagga

ctttGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAA
 ACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTCCA
 TTCTTTGGATTCAAGTTGGCATGGGTGAGCACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGTTT
 CTTAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACTGTGTACTGCAACTCCTCA**AGTGTTTTCTCC**
 5 **AGC**CTTCAATGGTACAGACAGGAGCCTGGGGAAGGTCCTGTCCTCCTGGTGACAG**GTGT**
TACTGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGACTTACCTTTCAGTTTGGTGATGCAAGAA
 AGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAGCCCAGCCTGGTGATACAGGCCTCTACCTC**TGT**
GCAGGAGATGAAAGTATTAGCTATGGAAAGCTGACATTTGGACAAGGGACCATCTTGA
 CTGTCCATCCAaacaatccagaacccccgacccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcggtgt
 10 gtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtgaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctgg
 acatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaac
 aacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactgggtggagaagtccttcgagaca
 gacaccaatctgaacttcagaacctgctggtgatcgctgctgcggattctgctgctgaaagtggccggccttcaatctgctgatgaccct
 gcggctgtggagc

15

Secuencia de proteína ORF beta y alfa completa

MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPI**SGHDY**LFWYRQTMMRG
 LELLIY**FNNNVP**IDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF**CASSFLGWNEKLF**
EGSGTQLSVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwwngkevhsgvstpdqpplkeqpals
 20 ryclssrlrvsatfwqnpnrnhfrcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhggvlsatilyeillgkatlyavlv
 salvlmamvkrkdfGSGRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVLKFSVSILWIQLAWVSTQL
 LEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSS**SVFSS**LQWYRQEPGEGPVLLVT**VVTGGEV**KKLKRLTFQF
 GDARKDSSLHITAAQPGDTGLYL**CAGDESISYGKLT**FGQGTILTVHPNi qnpdpavyqlrdsksdks
 vclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdn
 25 Infqnllvivlrilllkvagfnllmtlrllws

* La Tabla 2 proporciona, en parte, secuencias de TCR representativas agrupadas de acuerdo con la presentación de serotipo de MHC y subagrupadas de acuerdo con diferentes péptidos presentados por el serotipo de MHC y unidas por los TCR subagrupados. Se describen y
 30 reivindican TCR individuales, tal como los ejemplificados de manera representativa en las tablas, así como el género de proteínas de unión que se unen a una secuencia de epítomos

peptídicos descrita en la presente, ya sea solo o en un complejo con un MHC, tal como los agrupados en las tablas proporcionadas en la presente. Además, se proporcionan los genes TRAV, TRAJ y TRAC para cada cadena alfa de TCR descrita en la presente, y los genes TRBV, TRBJ y TRBC para cada cadena beta de TCR descrita en la presente. Las secuencias para cada TCR descrito en la presente se proporcionan como pares de cadenas alfa y cadenas beta afines para cada TCR nombrado. Las secuencias de TCR descritas en la presente están anotadas. Las secuencias de dominio variable están en mayúscula. Las secuencias de dominio constante están en minúsculas. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 se anotan usando texto en negrita y subrayado. CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en orden estándar de aparición desde la izquierda (extremo N-terminal) hasta la derecha (extremo C-terminal). Los genes TRAV, TRAJ y TRAC para cada cadena alfa de TCR descrita en la presente, y los genes TRBV, TRBJ y TRBC para cada cadena beta de TCR descrita en la presente, se anotan de acuerdo con la bien conocida nomenclatura IMGT descrita en la presente. De manera similar, CDR1 y CDR2 de TRAV y TRBV son conocidas en la técnica ya que se basan en secuencias TRAV y TRBV conocidas y anotadas (por ejemplo, como se registran en bases de datos como IMGT disponible en imt.org e IEDB disponible en iedb.org).

Tabla 3

Secuencia de ADNc de MAGEA1 humana representativa

20 atgtctcttgagcagaggagtctgcactgcaagcctgaggaagcccttgaggcccaacaagaggccctgggacctggtgtgtgtgc
aggctgccacctctctctctctctctggtcctgggcaccctggaggaggtgccactgctgggtcaacagatcctcccagagtc
ctcagggagcctccgcctttccactaccatcaacttcactcgacagaggcaaccacagtgagggttcagcagccgtgaagagg
aggggccaagcacctctgtatcctggagtcctgttccgagcagtaatacctaagaagggtggctgatttggtggtttctgctcctca
aatatcgagccaggagccagtcacaaaggcagaaatgctggagagtgtcatcaaaaattacaagcactgttttctgagatctt
25 cggcaaagcctctgagtccttgacgtggctctttggcattgacgtgaaggaagcagaccccaccggccactcctatgtccttgtcac
ctgcctaggtctctcctatgatggcctgctgggtgataatcagatcatgccaagacaggcttcctgataattgtcctggcatgattgc
aatggagggcgggccatgctcctgaggaggaaatctgggaggagctgagtgtgatggagggtgatgatgggagggagcacagtgc
cctatggggagcccaggaagctgctcacccaagatttgggtgcaggaaaagtacctggagtagccggcaggtgccggacagtgat
cccgcacgctatgagttcctgtggggtccaagggccctcgctgaaaccagctatgtgaaagtccttgagtatgtgatcaaggtcagt
30 gca**agaggttcgctttttctcccatccctgcgtgaagc**agctttgagagaggaggaagaggggagctctga

Secuencia de proteína de MAGEA1 humana representativa

MSLEQRSLHCKPEEAEALQQAALGLVCVQAATSSSSPLVLGTLEEVPTAGSTDPPQSPQGA
 SAFPTTINFTRQRQPSEGSSSREEEGPSTSCILESLFRAVITKKVADLVGFLLLKYRAREPVTK
 AEMLESVIKNYKHCPEIFGKASESLQLVFGIDVKEADPTGHSYVLVTCLGLSYDGLLDGNQI
 5 MPKTGFLIIVLVMIAMEGGHAPEEEIWEELSVMEVYDGREHSAYGEPRKLLTQDLVQEKYLE
 YRQVPDSDPARYEFLWGPRLAETSYVKVLEYVIKVSARVRFFFPSLREA
 ALREEEEGV*

Secuencia de ADN HLA-C*07:02 humana representativa

10 atgcgcgtcatggctccacgcgccctcctctgctgctctcagggggcctggccctgaccgagacctgggctgctccactccat
 gcgctatttcgacaccgccgtgtcccgccagggccgcggtgagccacgcttcatctcagtgaggctacgtggacgacactcagttcg
 tgcgcttcgacagcgacgccgagtcctcgcggggagccacgcgcacatgggtggagcaggaggggctgagattggga
 ccgcgagacacagaagtacaagcgccaggcacaggctgaccgcgtgagcctgcgcaacctgcgcggctactacaaccaga
 gcgaggacgggtctcacaccctccagcgcatgtctggctgcgacctggggcctgacgggcgctcctccgcgggtatgaccagt
 15 ccgcctacgacggcaaggattacatcgccctgaacgaggacctgcgctcctggaccgccgtgacaccgccgtcagatcacc
 cagcgcaagttggaggctgcccgcgccgctgagcagctgcgcgcctacctggaggggcacatgcgtggagtggctccgccgcta
 cctggagaacgggaaggagaccctgcagcgcgagaaaccaccaaagacacacgtgaccaccaccctctctctgacctga
 ggccaccctgcgctgctgggccctgggcttctaccctgctgagatcacactgacctggcagcgcgatggggaggaccagacca
 ggacaccgagcttgaggagacccgccagcaggtgatggcaccttcagaagtgggcagctgtggtgggtgccttctgggcaaga
 20 gcagcgctacatgccatgatgcagcacgaggggctgcaagagccactcaccctgagctgggagccatctccagccaacca
 tccaatcatgggcatcgttgctggcctggctgtcctgggtgtcctgggtgtgtgtgaccgctatgatgtgtcgccgaa
 gagctcaggtgggaaaggtgggagctgctctcaggctgcatgcagcaacagtgcccagggtctgatgagctctcatcacttgta
 aagcctga

25 Secuencia de proteína HLA-C*07:02 humana representativa

MRVMAPRALLLLLSGGLALTETWACSHSMRYFDTAVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFD
 SDAASPRGEPRAPWWEQEGPEYWDRETQKYKRQAQADRVSLRNLRGYYNQSEDGSHTLQ
 RMSGCDLGPDRLLRGYDQSAYDGKDIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQLR
 AYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQ
 30 RDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSPGEQRYTCHMQHEGLQEPLTSLWEPS
 SQPTIPIMGIVAGLAVLVVLAVLGAVVTAMMCRRKSSGGKGGSCSQAACSNSAQGSDESLIT

CKA*

Secuencia de ADN de LAMB4-intrón conservado humana representativa (secuencia de codificación; CDS) (conservación de intrón se muestra en texto en mayúsculas)

5 atgcaatttcaactgaccctttttgacacttgggtggctcagttactcaaaagctcaagatgactgcaacaggggtgctgtcatccc
 accactggtgatctcctgggtgggcaggaacacgcagcttatggcttctctacctgtgggtgagcagagcccagaaatactgcatc
 ctgagttacctggagggggaacaaaaatgcttcatctgtgactctagatttccatgatgccgatgaccaaccaacagccacacc
 attgagaatgtcattgtaagtttgaaccagacagagaaaagaaatggtggcaatctgaaaatggtcttgatcatgtcagcatcaga
 ctggacttagaggcattatttcgggtcagccaccttatcctgacctttaagacttttcggcctgctgcaatgttagttgaacgttccacaga
 10 ctatggacacaactggaaagtgttcaaatattttgcaaaagactgtgccacttccttcctaaccatcacatctggccaggcccaggg
 agtgggagacattgtttgtgactccaaatactcggatattgaacctcaacaggtggagaggtgttttaaagtttggatcccagttt
 gaaattgaaaacccttatagccccctacatccaagaccttgtagacattgacaaacctgaggataaaccttaccagctccacaccctt
 ggggatgctttgcttggaaggaggcaaaatgattcccttgataaatactactatgctctgtacgagatgattgttcggggaagctgctt
 tgcaatggccatgctagcgaatgtcgccctatgcagaagatgcggggagatgtttcagccctcctggaatggttcacggtcagtgt
 15 gtgtgtcagcacaatacagatggtccgaactgtgagagatgaaggacttctccaggatgctccttgaggccagctgcagacct
 ccaggacaacgcttgagatcgtgcagctgtaatagccactccagccgctgtcactttgacatgactacgtacctggcaagcgggtg
 gcctcagcgggggctgtgtgaagactgccagcacaacactgaggggcagcactgcgaccgctgcagacccctcttctacagg
 gacccgctcaagaccatctcagatccctacgcgtgcattccttgtaatgtgaccccgatgggaccatatctggtggcatttgtgtga
 gccactctgatcctgccttagggctgtggccggccagtgccctttaaagagaacgtggaaggagccaaatgcgaccagtgcaa
 20 acccaaccactacggactaagcgccaccgacccccctgggtgccagccctgcgactgaacccccctgggagctgccattcttg
 acctgtgatgtggatacaggccaatgcttgtgcctgtcatatgtcaccggagcacactgcgaagaatgcactgttgatactggggc
 ctgggaaatcatctccatgggtgttctccctgtgactgtgatattggaggtgcttattctaactgtgtcaccacaagaatgggcagtgt
 gaatgccgcccacatgtcactggccgtagctgtctgaaccagccccctggctacttcttctccttgaatttctatctctacgaggca
 gaggaagccacaacactccaaggactggcgcccttgggctcggagacgtttggccagagtccgtgttcacgtgttttaggaga
 25 gccagttcctgggaaccctgttacatggactggacctggatttgccaggggttctccctggggctggcttgagatttgtgtcaacaac
 attccctttctgtggacttcaccattgccattcactatgaaacccagctgcagctgactggactgtccagattgtggtgaacccccct
 ggagggagtgcagcactgcatacccaagactctacagtcaaaagcctcagctcttttgccctaccagcggctacgagaatcatgtgctt
 cccacacccatctgtttagaaccagatgtacaatattccatagatgtctattttctcagccttgcaaggagagtcccacgctcattca
 catgtcctgggtgactctcttggccttattcccaaatcaattcattggagaatttctgcagcaagcaggacttagatgagtatcagctt
 30 cacaactgtgttgaattgcctcagcaatgggacctcaagtgtcccggtgctgtgaaaggctgatcatcagcatgtctgcaa
 gctgcatgatggggctgtggcctgcaagtgtcacccccagggctcagtcggatccagctgcagccgacttgaggccagtgcca

gtgtaaacctctgtggcggcgctgctgtgacaggtgctcaactggaagctatgattggggcatcacggctgtcacccatgtcac
 tgccatcctcaaggatcaaaggacactgtatgtgaccaagtaacaggacagtggccctgccatggagaggtgtctggccgcccgt
 gtgatcgctgcctggcaggctactttggattcccagctgccaccctgccctgtaataggttgctgaactttgtatcctgagacagg
 gtcattgctcaattgtggaggctttacaactggcagaaaacttgaaagggtgattgatgggtactatggaaatccttctcaggacagc
 5 cctgtcgtccttgccgtgtccagatgatccctcaagcaatcagtattttgccattcctgttatcagaatctgtggagctcagatgtaac
 tgcaattgtctcaagggtatcacgggtactcagtggtgagaatgctctactgggttctatggaaatccaagaatttcaggagcaccttgc
 caacatgtgcctgcaacaacaacatagatgtaaccgatccagagtcctgcagccgggtaacaggggagtgccctcgatgtttgc
 acaacactcagggcgcaaaactgccagctctgcaaaccagggtcactatggatcagccctcaatcagacctgcagaagatgtcct
 gccatgcttccggcgtagtcccatggagtggtccccctgggtgggggagcttgccctgtgaccctgtcactgggtgcatgtcctgtctgc
 10 cgaatgtcacaggcctggcctgtgaccgtgtgctgtatggatactggaatctggtcctggcagaggatgtcagtcattgtgactgtga
 ccctaggacctctcaaagtagccacttgaccagcttacaggccagtgccgtgtaaattaggttacggcgggaaacgttgcagtg
 agtgccaggaaaattattatgggtgatccacctgggcgatgcattccatgtgattgtaacagggcaggtaccagaagcccattctgtg
 atccagacacaggcatgtgccgtgccgggaggggtgcagcgccagagatgtgatcgctgtgccggggacacagccagga
 attccctactgtctcaatgtcactgtgtttgatcagtgggaccacaccatttctccctctcaaagcgggtgaagggttaatgaga
 15 ctggctgctaacatggaagataaaagagagaccctgcctgtctgtgaggcagacttcaaagacctcagagggaacgtgtctgaa
 atagaaaggattttgaaacatcctgttttcccatctgggaaattcttaaaagtcaaggattatcatgactctgttagaagacaaatcatg
 cagctaaatgaacaactgaaagcagtgatgaattcaagatctgaaagatacaatagaaagagcaaagaatgaagcagacct
 ctacttgaagaccttcaggaagaaattgatttgaatccagtgcttcaatgcaagcattgcggactcctcagaaaacatcaagaa
 atattatcacatatcatcatctgtgaaaagaaaattaatgaaactagttccaccattaatacctctgcaaatacaaggaatgactta
 20 ctaccatcttagatacactaacctcaaaaggaaactgtcattggaaagattaaagcagattaagataccagatatccaaatattg
 aatgaaaagggtgtgcggagatccaggaaatgtccatgtgtgcccttgccctgtggcggtgctctctgcacgggcccgaaggggc
 acaggaagtgtaggggtcccggctgtcacggctccctgaccctctcaacgaatgccctcaaaaagcccaggaagcaaaatcc
 attattcgtaatttgacaaacagggttcgtgggtgaaaaatcagatcgaaagtataagtgaacaggcagaagtctcaaaaaca
 atgccttacagctgagggaaaaactgggaaatataagaaaccaaagtgactctgaagaagaaaacatcaatctttcatcaaaa
 25 aagtgaaaaactttttgtagGTAATTTAAAAATATATATTAGGACTAGTTTTTGTTTTTTCCCTTTTT
 AATGTATAGTCAAACATCATACGTGAACCCAGGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCCGAGAT
 CGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATCATAGCCAGTTCCAAATTAT
 ATTAATTGGAAATGACAAGCCTAAATCAGAAAAA

30

Secuencia de proteína de LAMB4-intrón conservado humana representativa (secuencia

de codificación; CDS) (conservación de intrón se muestra en texto en negrita; supuesto epítopo con reactividad cruzada subrayado)

MQFQLTLFLHLGWSYSKAQDDCNRGACHPTTGDLLVGRNTQLMASSTCGLSRAQKYCILS
 YLEGEQKCFICDSRFPYDPYDQPNSTIENVIVSFEPDREKKWWQSENGLDHVSIRLDLEAL
 5 FRFSLILTFKTRPAAMLVERSTDYGHNWKVFKYFAKDCATSFPNITSGQAQGVGDIVCDS
 KYSDIEPSTGGEVVLKVLDPSEFIENPYSPIQDLVTLTNLRINFTKLHTLGDALLGRRQNDSL
 DKYYYALYEMIVRGSCFCNGHASECRPMQKMRGDVFSPPGMVHGQCVCQHNTDGPNCER
 CKDFFQDAPWRPAADLQDNACRSCSCNSHSSRCHFDMTTYLASGGLSGGVCEDCQHNT
 GQHCDRCRPLFYRDPLKTISDPYACIPCECDPDGTISGGICVSHSDPALGSVAGQCCLCKENV
 10 EGAKCDQCKPNHYGLSATDPLGCQPCDCNPLGSLPFLTCDVDTGQCLCLSYVTGAHCEEC
 TVGYWGLGNHLHGCSPCDCDIGGAYSNVCSPKNGQCECRPHVTGRSCSEPAPGYFFAPLN
 FYLYEAAEEATTLQGLAPLGSETFGQSPAVHVVLGEPVPGNPVTWTGPGFARVLPAGLRFA
 VNNIPFPVDFTIAIHETQSAADWTVQIVVNPPGGSEHCIPKTLQSKPQSFALPAATRIMLLPT
 PICLEPDVQYSIDVYFSQPLQGESHASHVLVDSLGLIPQINSLENFCSKQDLDEYQLHNCVEI
 15 ASAMGPQVLPGACERLIISMSAKLHDGAVACKCHPQGSVSSCSRLGGQCQCKPLVVGRC
 CDRCSTGSYDLGHHGCHPCHHPQGSKDTVCDQVTGQCPCHGEVSGRRCDRCLAGYFG
 FPSCHPCPCNRFAELCDPETGSCFNCGGFTTGRNCERCIDGYGNPSSGQPCRPCPCPDD
 PSSNQYFAHSCYQNLWSSDVICNCLQGYTGTQCGECSTGFYGNPRISGAPCQPCACNNNI
 DVTDPESCSRVTGECLRCLHNTQGANCQLCKPGHYGSALNQTCCRCSCHASGVSPMECP
 20 PGGGACLCDPVTGACPCLPNVTGLACDRCADGYWNLVPGRGCQSCDCDPRTSQSSHCDQ
 LTGQCPCKLGYGGKRCSECQENYYGDPPGRCIPDCNRAAGTQKPICDPDTGMCRCREGVS
 GQRCDRCARGHSQEFTCLQCHLCFDQWDHTISSLSKAVQGLMRLAANMEDKRETLPVCE
 ADFKDLRGNVSEIERILKHPVFPSPGKFLKVVDYHDSVRRQIMQLNEQLKAVYEFQDLKDTIER
 AKNEADLLLEDLQEEIDLQSSVLNASIADSSSENIKKYYHISSSAEKKINETSSSTINTSANTRNDL
 25 LTILDTLTSKGNLSLERLKQIKIPDIQILNEKVCGDPGNVPCVPLPCGGALCTGRKGHRKCRGP
 GCHGSLTLSTNALQKAQEAksiRNLDKQVRGLKNQIESISEQAEVSKNNALQLREKLGNI
 QSDSEENINLFIKKVKNFLL**GNLKIYIRTSFCFFPFLMYSQTSYVNPGGGACSEPRSRHCTP**
AWATERDSVSKKKKKKKKKKKKKKKKKKKHHSQFQIILIGNDKPKSEK

30 **Vector representativo (la proteína que codifica TCR de la cual se puede intercambiar con cualquier secuencia de TCR de interés): pTSLV102-MSCV-HA1-10-30-MGTM-Q-CD8**

tggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgattagcag
 aactacacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatgggtgctacaagctagtagaccagttgagccagataaggtag
 aagaggccaataaaggagagaaacaccagcttggtacaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgtta
 gagtggaggtttgacagccgcctagcatttcacacgtggccccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagc
 5 ttgctacaagggactttccgctggggactttccagggaggcgtggcctggggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgc
 atataagcagctgcttttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccac
 tgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgttcaagtagtgtgtgccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagac
 ccttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagtggcgccccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcg
 acgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgactgggtgagtacgcaaaaaatttgactagc
 10 ggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggt
 taaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtagggcaagcagggagctagaacgattcgagttaatcct
 ggctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttaga
 tcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttagacaagataga
 ggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccggcgtgatcttcagacctggaggaggagatatgag
 15 ggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaaggcaaagagaa
 gagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtggaataggagcttggctcctgggttctgggagcagcaggaagcactatgggcg
 cagcgtcaatgacgtgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgacgagcagaacaatttgctgagggctattgag
 gcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaag
 gatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataatc
 20 tctggaacagatttggaaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattg
 aagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttgtggaattggttaacat
 aacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttgtaggttaagaatagttttgctgtactttctatagtaga
 atagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatag
 aagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattaattcaciaa
 25 atggcagttatcatccacaattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagca
 acagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattcaaaaatttcgggtttattacaggCGcGCcagagatcc
 agtttggacCTgcAGGTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGtTAGCTTAAGTAACGCC
ATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAG
GAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTG
 30 **CCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTT**
TCTAGCGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCC

TTATTTGAACTAACCAATCAGTTtGCTTCTtGCTTCTGTTtGtGtGCTTCTGCTCCctGAGCT
 CAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTtGGtGgGCCAGTCCTCtGATAGACTGtGTCcCCt
 GGaTACCCGTAcggtaccgctagcgccaccATGGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGGCCCTGT
 GTCTCCTGGGGGGCAGATCACGCAGATACTGGAGTCTCCCAGGACCCCAGACACAAGA
 5 TCACAAAGAGGGGGACAGAATGTTACTTTcAGGTGTGATCCAATTTCTGAACACAACCG
 CCTTTATTGGTACCGCCAGACCCTGGGGCAGGGCCCAGAGTTTCTGACTTACTTCCAG
 AATGAAGCTCAACTTGAAAAATCAAGGCTGCTCAGTGATCGGTTCTCTGCAGAGAGGC
 CTAAGGGATCTTTCTCCACCTTGAGATCCAGCGCACAGAGCAGGGGGACTCTGCCAT
 GTATCTCTGTGCCAGCAGCCGCACTGCTGGAGATACTCAGTATTTTGGCCCAGGCACC
 10 CGGCTGACAGTGCTCGAAGATCTGAACAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTcG
 AGCCTTCTaAGGCCGAGATCgcccCACACaCaAaAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACC
 GGCTTTTTTCCCCGACCACGTGGAACtGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACT
 CCGGCGTGtcAACgGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCG
 GTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAA
 15 CCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCA
 GGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCG
 ATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGTA
 CGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTG
 ATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGC
 20 GGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGAC
 CTATGGAAACCCTcTTGGGCCTGCTTATCCTTTGGCTGCAGCTGCAATGGGTGAGCAG
CAAACAGGAGGTGACTCAGATTcCTGCAGCTCTGAGTGTCCCAGAAGGAGAAAACTT
GGTTCTCAACTGCAGTTTCACTGATAGCGCTATTTACAACCTCCAGTGGTTTAGGCAGG
ACCCTGGGAAAGGCCTCACATCTCTGTTGCTTATTCAGTCAAGTCAGAGAGAGCAAAC
 25 AAGTGGACGCCTTAATGCCTCTCTGGATAAATCATCAGGACGCAGTACTCTTTACATTG
CAGCTTCTCAGCCTGGTGATTcAGCCACCTACCTGTGCGCTGTGAGGGGTGGTACCTC
AGGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCACCAGGCTGAAGGTTCTTGCAAACATC
CAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGGGACTCCAAGTCCAGCGACAAGAGC
GTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGAGTCAAAGCAAGGACAGC
 30 GACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGC
AACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAAC

AACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGACGTGCCCTGCGACGTG
AAACTGGTGGAGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACTTTCAGAACCTGCTGG
TGATCGTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATGACCCT
GCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTTTCCCTG
5 CTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCTGGCCCCATGGCGCTGCCCGTCACCG
CGCTGCTGCTGCCCCTGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCAGAGCTTCCCACCCA
GGGCACATTCTCCAACGTGTCCACCAATGTGTCTGGGAGGCGGCGGATCGTCCCAGTTC
AGAGTGTCCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGAGCTGAAATGTC
AGGTCCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGCAGTTGGCTGTTCCAGCCGCGTGGTG
10 TGCCGCAAGCCCTACGTTCTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCGGCCGAG
GGCCTGGACACCCAGAGATTCTCCGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTCTGCTTACTTT
GAGCGATTTCCGCAGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGTTCTGGCGCTGAGCAATTCCA
TCATGTATTTAGCCACTTTGTGCCAGTGTTCTGCTGCCAAGCCTACCACAACACCAG
CTCCCCGTCCCCCGACTCCGGCGCCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGAGCCTGAGGCC
15 TGAGGCTTGTCGGCCCCGCTGCGGGGGGTGCCGTCCACACCAGGGGGCCTCGACTTTGC
GTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCTGCGGGGTGCTGCTGCTGTCA
TTGGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGGGTCTGTAAGTGCCACG
GCCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTGCGCGCTAAG
CGCAGCGGTTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATGTGGAGG
20 AGAATCCAGGGCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCTCACTGTC
TTGCATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACGAACAA
GATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGGCT
ACGACAGCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCTTTGGGAT
TCTGCTAAAGGCACCATCCATGGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTTCCG
25 CGACGCATCCCGCTTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCATC
TACTTCTGTATGATCGTTGGCTCCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTC
CGTGGTGGACTTCCTGCCACCACAGCCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCTCAAGAAGC
GCGTGTGCCGACTGCCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGCCCTCTGTGCTCCCCCATCAC
CCTTGGACTGCTGGTGGCGGGAGTCCTGGTGCTGCTCGTATCTCTGGGTGTCGCCATC
30 CACCTGTGCTGCCGCCGCCGCCGCCCTGAGGTTTATGAAACAGTTTTACAAGTG
ATAAatcgatagatcctaataaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctcctttacgctatgt

ggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgtattgcttcccgatggccttcattttctcctccttgataaatcctgggtgctgtctctttatga
 ggagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtgtgactgtgttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccac
 ctgtcagctcctttccgggactttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttggcgctgtggacag
 gggctcggctgttgggactgacaattccgtgggtgtgctggggaaatcatcgctcttcttggtgctcgcctgtgttgccacctggat
 5 tctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctc
 ttccgctgttgccttcgccctcagacgagtcggatctcccttggggcgccctccccgcctgagatccttaagaccaatgacttaca
 aggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatctgct
 tttgctgtactgggtctctgtggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacccactgcttaagcctcaata
 aagcttgccctgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgg
 10 aaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatattataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggcccg
 gttaattaaggaaagggttagatcattctgaagacgaaagggcctcgtgatacgccatttttataggtaatgtcatgataataatg
 gttcttagacgtcagggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctc
 atgagacaataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttt
 ttgcggcattttgccttctgttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggg
 15 ttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttct
 gctatgtggcgcggtattatcccggtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggtga
 gtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataac
 actgcggccaaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcg
 ccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaa
 20 cgttgcgcaaaactattaactggcgaactacttacttagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcag
 gaccacttctgcgtcggcccttccggctggtggtttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgca
 gcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaataga
 cagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgattaaaacttc
 attttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgctccactgagcgtca
 25 gaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctac
 cagcgggtggtttgttgccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacacaataactgt
 tcttctagttagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtggc
 tgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacg
 ggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcg
 30 ccacgcttccgaaggagaaaggcggaacaggtatccggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgagggagctt
 ccaggggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcggggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggg

cggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggttcctggccttttgctggcctttgctcacatgttcttctgcgttat
 ccCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCA
 GCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC
 GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGCAGCAAGCTCATGGCTGAC
 5 TAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT
 AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCCGTGGCACGACAG
 GTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
 ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
 GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTTACAAATAAAG
 10 CATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC
 TGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCCAAACCTCCCACCCCATAACCCT
 ATTACCACTGCCAATTACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCTCTGAATTAT
 TTTCATTTTAAAGAAATTGTATTTGTAAATATGTACTACAAACTtagtagt

- 15 **Vector representativo (la proteína que codifica TCR de la cual se puede intercambiar con cualquier secuencia de TCR de interés): pHAGE-MSCV-HN-P32-41-P2A-dnTGFbRII (con dnTGFbRII resaltado en texto en negrita)**

tggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcag
 20 aactacacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatggtgctacaagctagtagcagttgagccagataaggtag
 aagaggccaataaaggagagaaacaccagcttggtacaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgtta
 gagtggagggttgacagccgcctagcattcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtactcaagaactgctgatatcgagc
 ttgctacaagggactttccgctggggactttccagggaggcggtggcctgggagggactggggagtggcgagccctcagatcctgc
 atataagcagctgcttttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggggaaccac
 25 tgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgttcaagtagtgtgtgccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagac
 ccttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcg
 acgcaggactcggcttgctgaagcgcgacggcaagaggcgagggcgactgggtgagtacgcaaaaaatttgactagc
 ggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgctcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggt
 taaggccagggggaaagaaaaataaaataaaacatatagtagtggaagcagggagctagaacgattcgagttaatcct
 30 ggctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacagggatcagaagaacttaga
 tcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttagacaagataga

ggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgag
 ggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaaagagaa
 gagtggcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagcttggcttctgggagcagcaggaagcactatgggagc
 cagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagacaatttgctgagggctattgag
 5 gcgcaacagcatctgttgaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaag
 gatcaacagctcctggggatttggggtgctctggaaaactcattgcaccactgctgtgccttggaatgctagtggagtaataaatc
 tctggaacagatttgaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattg
 aagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttgtggaattgggttaacat
 acaaattggctgtggtatataaaaattattcataatgatagtaggaggcttggttaggttaagaatagttttgctgtactttctatagta
 10 atagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatag
 aagaagaaggaggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattaattcaca
 atggcagattatccacaattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagca
 acagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcggggttattacaggCGcGCcagagatcc
 agtttggacCTgcAGGTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGtTAGCTTAAGTAACGCCA
 15 TTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAA
 CAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCG
 GCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGC
 GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTG
 AACTAACCAATCAGTTtGCTTCTtGCTTCTGTTtGtGtGCTTCTGCTCCctGAGCTCAATAAAA
 20 GAGCCCACAACCCCTCACTtGGtGgGCCAGTCCTCtGATAGACTGtGTCCcCtGGaTACCCG
 TAcggtaccgctagcgccaccATGGGCTCCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTTGCATCCTGGT
 TGCAAAGCACACAGATGCTGGAGTTATCCAGTCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATG
 GGACAAGAAGTGACTCTGAGATGTAAACCAATTTcAGGACATGACTACCTTTTCTGGTAC
 AGACAGACCATGATGCGGGGACTGGAGTTGCTCATTtACTTTAACAACAACGTTcCTATT
 25 GATGATTcAGGGATGCCCCGAGGATCGCTTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTC
 CACTCTGAAGATCCAGCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTGTGCCAGCA
 GTTTTCTCGGCTGGAATGAAAACTGTTCTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGG
 AAGATCTGAACAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTcGAGCCTTCTaAGGCCGAG
 ATCgcccACACaCAaAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCAC
 30 GTGGAActGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACTCCGGCGTGtcAACgGATCC
 CCAGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGA

CTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAAACCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGC
 AGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGAC
 ACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCC
 TATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCA
 5 CCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGA
 CTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTG
 AAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTC
 CATTCTTTGGATTGAGTTGGCATGGGTGAGCACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGT
 TTCTTAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACTGTGTACTGCAACTCCTCAAGTGTTTTCT
 10 CCAGCCTTCAATGGTACAGACAGGAGCCTGGGGAAGGTCCTGTCCTCCTGGTGACAGTT
 GTTACTGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGACTTACCTTTGAGTTTGGTGATGCAAG
 AAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAGCCCAGCCTGGTGATACAGGCCTCTACCTCT
 GTGCAGGAGATGAAAGTATTAGCTATGGAAAGCTGACATTTGGACAAGGGACCATCTTG
 ACTGTCCATCCAAacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgt
 15 gtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgct
 ggacatgaggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgctcgccaacgccttca
 acaacagcatcatccccgaggacaccttctccccagcagcgacgtgccctgagcgtgaaactggtggagaagtccttcgaga
 cagacaccaatctgaacttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATC
 TGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCA
 20 CCAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCCCATGGGT
CGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCC
AGCACGATCCCACCGCACGTTCAAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACA
ACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACC
TGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGC
 25 CACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGA
 CAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCT
 CCAAAGTGCAATTATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCT
 GTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAA
 TCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGG
 30 GAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTaaccggcagcagaagTAG
 TGATAAatcgatagatcctaataacacctggtattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatggtgctcctttacgct

atgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgataggctttcatcttctccttgataaatcctgggtgctgtcttta
 tgaggagtgtggcccggtgtcaggcaacgtggcggtggtgtgactgtgttctgacgcaacccccactgggtggggcattgccac
 cacctgtcagctccttccgggactttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcctggccgctgctggac
 aggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgcttcttgggtgctcgctgtgttgcacctg
 5 gattctgcgcgggacgtccttctgtacgtccctcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcgccctgctgccggctctgcgg
 ccttctccgcttctgccttcgcccctagacgagtcggatctcccttgggcccctccccgcctgagatccttaagaccaatgactt
 acaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatc
 tgcttttgcctgtactgggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggtaactaggggaacccactgcttaagcctca
 ataaagcttgccctgagtgttcaagtagtgtgtgcccgctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgt
 10 ggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttattataacttgcaaagaaatgaatacagagagttagaggccc
 gggtaattaaggaaagggttagatcattctgaagacgaaaggcctcgtgatacgccctattttataggtaatgtcatgataataa
 tggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgc
 tcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccc
 tttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgt
 15 ggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagt
 tctgctatgtggcgcggtattatcccggtgttgacgcgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggtt
 gagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacatgagtata
 aactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaact
 cgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaac
 20 aacgttgcgcaactattaactggcgaactacttacttagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgc
 aggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattg
 cagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaata
 gacagatcgctgagatagggtcctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgattaaaac
 ttcattttaatttaaaaggatctagggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttctgtccactgagcgt
 25 cagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgct
 accagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatac
 tgttcttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactctgttaccagtgt
 gctgtgccagtggcgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaa
 cgggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaag
 30 cgccacgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggggtcggaaacaggagagcgcacgaggggag
 cttccaggggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgtcgtcagggg

ggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtcctggccttttgctggccttttgctcacatgttcttctgcgtt
 atccCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
 AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATA
 CGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTGGCCGATTCATTAATGCAGCAAGCTCATGGCTGA
 5 CTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAG
 TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCCGTGGCACGACA
 GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACT
 CATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG
 AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTTACAAATAAA
 10 GCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT
 CTGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCCAAACCTTCCCACCCCATACCC
 TATTACCACTGCCAATTACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCCTCTGAATTA
 TTTTCATTTTAAAGAAATTGTATTTGTTAAATATGTACTACAAACTtagtagt

15 **Vector representativo (la proteína que codifica TCR de la cual se puede intercambiar con cualquier secuencia de TCR de interés): pNVVD142_TSC-204-C07_TCR-41_MSCV-TCR41-CD8-EF1a-TGFR-DHFR**

GAATTCGTCGACGCTAGCTGGCTTGTTGTCCACAACCATTAACCTTAAAAGCTTTAAAA
 20 GCCTTATATATTCTTTTTTTTTCTTATAAACTTAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGA
 TTTATATTAATTTTATTGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTA
 CATTAGCCATGAGAGCTTAGTACATTAGCCATGAGGGTTTAGTTTATTAAACATGAGAGC
 TTAGTACATTAAACATGAGAGCTTAGTACATACTATCAACAGGTTGAACTGCTGATCTGTA
 CAGTAGAATTGGTAAAGAGAGTTGTGTAAAATATTGAGTTTCGCACATCTTGTTGTCTGATT
 25 ATTGATTTTTTGGCGAAACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACTTAATG
 ATTTTGATAAAAATCATTAGGTACCAATTACATTGCTTGCAATTAACCTTTAACGGTTATA
 AGGATCTAGATGAGATAGAAAGATTTGGTTTTTCGGATTTGTGTTACATAAGATGCCTAAAA
 TAAAAATTGAGATTCAATTTTTTTTAACTTTTTTTTAAATTGGTGGTAAGAATATTCCCTCTA
 CCTGTTTGAGAGTAATGAAATTGTAGTATGATTTTTCAACAACTAAAAAACACATAAA
 30 TCTCACATAATACTTTATTTCAATCACACAATTGAATACCAATAGGTTGACAGTACTTAC
 CAGCCTGCAGGTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGTTAGCTTAAGTAACGCCA

TTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGG
 AACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGC
 CCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTT
 CTAGCGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCT
 5 TATTTGAACTAACCAATCAGTTTGCTTCTTGCTTCTGTTTGTGTGCTTCTGCTCCCTGAG
 CTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTTGGTGGGCCAGTCCTCTGATAGACTGTGT
 CCCCTGGATACCCGTACGGTACCGCTAGCGCCACCATGGGGCTCCTGGACCCTCTGCTG
 TGTGTCCCTTTGCATCCTGGTTGCAAAGCACACAGATGCTGGAGTTATCCAGTCACCC
 CGGCACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAAGTGACTCTGAGATGTAAACCAATTTCA
 10 GGACATGACTACCTTTTCTGGTACAGACAGACCATGATGCGGGGACTGGAGTTGCTCA
 TTTACTTCAACAACAACGTTTCTATTGATGATTCAGGGATGCCCCGAGGATCGCTTCTCA
 GCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTCCACTCTGAAGATCCAGCCCTCAGAACCCAGGG
 ACTCAGCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTTTCTCGGCTGGAATGAAAACTGTTCTTT
 GGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGGAAGATCTGAACAAGGTGTTCCCTCCAGAGG
 15 TGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTAAGGCCGAGATCGCCACACACAAAAAGCCACCCTCGT
 GTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGC
 AAAGAGGTGCACTCCGGCGTGTCAACGGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCC
 CTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGG
 CAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAAC
 20 GACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCC
 TGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGTGCTGAGC
 GCCACAATCCTGTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGT
 CTGCTCTGGTGTCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCA
 AAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGA
 25 AGAGAACCCCGGACCTATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTCCATTCTTTGGATTCAGTTGG
CATGGGTGAGCACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGTTTCTTAGCATCCAAGAGG
GAGAAAATCTCACTGTGTACTGCAACTCCTCAAGTGTTTTCTCCAGCCTTCAATGGTAC
AGACAGGAGCCTGGGGAAGGTCCTGTCCTCCTGGTGACAGTTGTTACTGGTGGAGAA
GTGAAGAAGCTGAAGAGACTTACCTTTCAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTCTC
 30 TCCACATCACTGCAGCCCAGCCTGGTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCAGGAGATGA
AAGTATTAGCTATGGAAAGCTGACATTTGGACAAGGGACCATCTTGACTGTCCATCCA

AACATCCAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGGGACTCCAAGTCCAGCGAC
AAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGAGTCAAAGCAAG
GACAGCGACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTC
AAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCC
5 TTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGACGTGCCCTGCG
ACGTGAAACTGGTGGAGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACTTTCAGAACCT
GCTGGTGATCGTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATG
ACCCTGCGGGCTGTGGAGCAGCAGGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCACCAATTTT
CCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCCCATGGCGCTGCCCGT
10 CACCGCGCTGCTGCTGCCCCCTGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCAGAGCTTCCC
ACCCAGGGCACATTCTCCAACGTGTCCACCAATGTGTCTGGGAGGCGGCGGATCGTCCC
AGTTCAGAGTGTCCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGAGCTGAA
ATGTCAGGTCCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGCAGTTGGCTGTTCCAGCCGCGT
GGTGCTGCCGCAAGCCCTACGTTCTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCGG
15 CCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATTCTCCGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTCGTGCT
TACTTTGAGCGATTTCCGCAGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGTTCTGGCGCTGAGCA
ATTCCATCATGTATTTACGCCACTTTGTGCCAGTGTTCTGCCTGCCAAGCCTACCACAA
CACCAGCTCCCCGTCCCCCGACTCCGGCGCCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGAGCCT
GAGGCCTGAGGCTTGTCGGCCCCGCTGCGGGGGGTGCCGTCCACACCAGGGGGCCTCGA
20 CTTTGCGTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCTGCGGGGTGCTGCTG
CTGTCATTGGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGGGTCTGTAAGTG
CCCACGGCCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTGCGC
GCTAAGCGCAGCGGTTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATG
TGGAGGAGAATCCAGGGCCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCT
25 CACTGTCTTG CATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGA
CGAACAAGATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTTTCAAATATGAGAATTT
ATTGGCTACGACAGCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCT
TTGGGATTCTGCTAAAGGCACCATCCATGGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCT
GTCTTCCGCGACGCATCCCGCTTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACA
30 GCGGCATCTACTTCTGTATGATCGTTGGCTCCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACC
CAGCTGTCCGTGGTGGACTTCCTGCCCACCACAGCCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCT

CAAGAAGCGCGTGTGCCGACTGCCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGGCCCTCTGTGCTCC
CCCATCACCTTTGGACTGCTGGTGGCGGGAGTCCTGGTGCTGCTCGTATCTCTGGGTG
TCGCCATCCACCTGTGCTGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTGAGGTTTATGAAACAGTT
TTACAAGTGATAAATCGATGGAAGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTC
5 CTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTG
CATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATG
GAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCA
AGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTC AAGC
GATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCA
10 GCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCA
ACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGT
GAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTTCTGATTACTAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGG
GCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGTGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAA
CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCT
15 CCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAAC
GTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCG
CGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGC
TGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAG
GCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGC
20 TGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATA
AGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAG
TCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCCGGGCG
GCGACGGGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCCTGCGAGCG
CGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT
25 GGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCA
CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAT
GGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGG
CCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG
GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGT
30 TTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGG
CACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCA

AGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAACTAGTCCAG
TGTGGTGAATTCTGCAGATATCACGGCTAGCGCCACCATGGGTTCGGGGGCTGCTCAG
GGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCG
CACGTTTCAGAAAGTCGGTGAATAACGACATGATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAA
5 GTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCC
TGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGC
TGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGC
TCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAGA
AGAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATGACA
10 ACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCA
AGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTT
CTACTGCTACCGCGTGAACCGGCAGCAGAAGGCTAGTGGTTCAGGCGCAACGAATTTCT
CTTTGCTGAAGCAGGCTGGGGATGTCTGAAGAAAATCCGGGTCCAATGGTGGGCTCGCT
CAACTGCATCGTAGCAGTCTCCCAGAATATGGGCATCGGGAAGAACGGTGATTTCCCGT
15 GGCCCCCACTTCGCAACGAGAGCCGTTATTTCCAAAGAATGACTACAACCTCCTCCGTG
GAGGGTAAGCAGAACCTGGTCATCATGGGGAAGAAGACCTGGTTCTCTATCCCTGAAAA
AAACCGCCCCCTGAAGGGCCGCATCAACCTGGTGCTGAGCAGGGAACTCAAGGAGCCT
CCTCAGGGCGCGCATTTTCTGAGCCGCTCATTGGATGACGCTCTCAAACCTGACCGAACA
GCCGGAGCTAGCCAACAAGGTGGACATGGTGTGGATCGTCGGAGGCTCCTCCGTGTAC
20 AAGGAGGCCATGAATCACCCCGGCCACTTGAAGCTGTTTCGTCACCCGGATCATGCAGG
ACTTCGAGTCGGACACGTTCTTTCCAGAGATTGACCTGGAGAAGTACAAGCTGCTGCCC
GAGTACCCGGGAGTTCTTAGTGATGTGCAGGAGGAGAAAGGCATCAAGTACAAATTTGA
GGTGACGAGAAGAACGACTAACGGTCCGTCCTGACCAATGCTGGAGTTCTTCGCCCCAC
CCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA
25 CAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCT
TATCATGTCTGTATACAGGTTACCTCAGTCTCCTAGGTACGTCTTATATCTATGAAAAAC
ATTCAAAAGCACACATCTAGAAGAACTTACCTTTTTTACCCTCTATTGCAAAGATATG
TACCGATTTCTCTCGAAGTACAAAAAACCGCTAGTTTTCAAATTCACCTCAAGACTTTGAA
AAAAAATTGAATCTGTCAATGTCAAATAAAATCAGAAACAAATGTCATAATGTTACGTTAAT
30 GTTGTGAGGTCGAAAAATAAAATTGCAAATAGAAATTTTGTTCCTTTTTTATTGGTTTTTAT
TGGTGGGAAAAATATTCCCTCTAACTGCAAAAGGGTTAATTATGTTAGAGGTAGAGTCGA

CAAGCTT

Mapa del vector de pNVVD142_TSC-204-C07_TCR-41_MSCV-TCR41-CD8-EF1a-TGFR-DHFR



5

Referencias: CD: conjunto de diferenciación RNA-OUT: ARN antisentido contra levansucrasa bacteriana codificada por sacB. SV: virus símico TCR: receptor de células T, TIR: repetición invertida terminal, QBend: anticuerpo CD34 antihumano de ratón, dnTGFβRII: receptor TGF beta negativo dominante II, DHFR: marcador de selección de dihidrofolato reductasa

10

* Para determinados vectores ilustrados, el promotor MSCV está en negrita. La cadena beta

está anotada usando texto en negrita y cursiva. La cadena alfa está anotada usando texto en negrita y subrayado. La etiqueta de enriquecimiento CD34 (etiqueta Q) está anotada usando texto en cursiva y subrayado. CD8-alfa está en cursiva. CD8-beta está subrayado.

5 *En las Tablas 1-3 se incluyen epítomos peptídicos, así como moléculas polipeptídicas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o más identidad en su longitud completa con una secuencia de aminoácidos de cualquier secuencia indicada en la Tabla 1, o una porción de esta. Dichos polipéptidos pueden
10 tener una función del péptido o polipéptido de longitud completa como se describe adicionalmente en la presente.

* En las Tablas 2 y 3 se incluyen moléculas de ácido nucleico de ARN (*p. ej.*, timinas reemplazadas con uredinas), moléculas de ácido nucleico que codifican ortólogos de las
15 proteínas codificadas, así como secuencias de ácido nucleico de ADN o ARN que comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o más identidad en su longitud completa con la secuencia de ácido nucleico de cualquier secuencia enumerada en las Tablas 2 o 3, o una porción de esta. Dichas moléculas de ácido
20 nucleico pueden tener una función del ácido nucleico de longitud completa como se describe adicionalmente en la presente.

En algunas modalidades, las proteínas de unión proporcionadas en la presente comprenden una región constante que es quimérica, humanizada, humana, de primate o de roedor (por
25 ejemplo, rata o ratón). Por ejemplo, una región variable humana se puede quimerizar con una región constante murina o una región variable murina se puede humanizar con una región constante humana y/o regiones marco humanas. En algunas modalidades, las regiones constantes se pueden mutar para modificar la funcionalidad (por ejemplo, la introducción de sustituciones de cisteína de origen no natural en ubicaciones de residuos opuestos en las
30 cadenas alfa y beta de TCR para proporcionar uniones disulfuro útiles para aumentar la afinidad entre las cadenas alfa y beta de TCR). De manera similar, se pueden realizar

mutaciones en el dominio transmembrana de la región constante para modificar la funcionalidad (por ejemplo, aumentar la hidrofobicidad mediante la introducción de una sustitución de origen no natural de un residuo con un aminoácido hidrofóbico). En algunas modalidades, cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, 5 eliminaciones de aminoácidos, o una combinación de estos en comparación con una secuencia de CDR de referencia. En algunas modalidades, se pueden realizar mutaciones en la región constante para aumentar la expresión en la superficie celular.

En algunas modalidades, las proteínas de unión descritas en la presente pueden ser estructuras proteicas modificadas genéticamente, un anticuerpo o un fragmento de unión al 10 antígeno de este, anticuerpos que imitan TCR, y similares. Dichos restos de unión se pueden diseñar y/o generar contra péptidos y/o complejos de MHC-péptido descritos en la presente usando métodos inmunológicos de rutina, tal como inmunización de un hospedador, obtención de células que producen anticuerpos y/o anticuerpos de estos, y generación de hibridomas útiles para producir anticuerpos monoclonales (por ejemplo, Watt *et ál.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 15 24:177-183; Gebauer y Skerra (2009) *Curr. Opin. Chem Biol.* 13:245-255; Skerra *et ál.* (2008) *FEBS J.* 275:2677-2683; Nygren *et ál.* (2008) *FEBS J.* 275:2668-2676; Dana *et ál.* (2012) *Exp. Rev. Mol. Med.* 14:e6; Sergeva *et ál.* (2011) *Blood* 117:4262-4272; Publ. PCT n.º WO 2007/143104, PCT/US86/02269 y WO 86/01533; patente estadounidense n.º 4,816,567; Better *et ál.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 20 84:3439-3443; Liu *et ál.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:214; Patente estadounidense No. 5,225,539; Jones *et ál.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; 25 y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060. Si se desea, los restos de unión se pueden aislar o purificar usando procedimientos convencionales tales como, por ejemplo, la proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía por afinidad, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina y 30 cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (por ejemplo, Current Protocols in

Immunology, o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y.).

Los términos «anticuerpo» y «anticuerpos» abarcan de manera amplia formas de origen natural de anticuerpos (p. ej., IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos, así como fragmentos y derivados de todos los anteriores, cuyos fragmentos y derivados tienen al menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpos pueden comprender una proteína o resto químico conjugado con un anticuerpo.

Además, los intracuerpos son moléculas de unión al antígeno bien conocidas que tienen la característica de anticuerpos, pero son capaces de expresarse dentro de las células para unirse a y/o inhibir dianas intracelulares de interés (Chen *et ál.* (1994) *Human Gene Ther.* 5:595-601). En la técnica se conocen métodos para adaptar anticuerpos para que se dirijan (por ejemplo, inhiban) restos intracelulares, tal como el uso de anticuerpos de cadena simple (scFvs), la modificación de dominios VL de inmunoglobulina para hiperestabilidad, modificación de anticuerpos para que resistan al entorno intracelular reducido, generación de proteínas de fusión que aumenten la estabilidad intracelular y/o modulen la localización intracelular, y similares. Los anticuerpos intracelulares también se pueden introducir y expresar en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo, con fines profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como terapia génica) (ver, al menos la Publ. PCT n.º WO 08/020079, WO 94/02610, WO 95/22618 y WO 03/014960; patente estadounidense n.º 7,004,940; Cattaneo y Biocca (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications* (Landes y Springer-Verlag pubs.); Kontermann (2004) *Methods* 34:163-170; Cohen *et ál.* (1998) *Oncogene* 17:2445-2456; Auf der Maur *et ál.* (2001) *FEBS Lett.* 508:407-412; Shaki-Loewenstein *et ál.* (2005) *J. Immunol. Meth.* 303:19-39).

El término «anticuerpo», tal como se usa en la presente, también incluye una «parte de unión al antígeno» de un anticuerpo (o simplemente una «parte de anticuerpo»). La expresión «porción de unión al antígeno», como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específica y/o selectivamente a un antígeno (p. ej., un péptido y/o un complejo MHC-péptido descrito en la presente). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión «porción de unión a antígeno» de un anticuerpo incluyen (i)

un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo simple de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, so codificados por genes separados, se pueden unir al usar métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite que se produzcan como una cadena proteica simple en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar polipéptidos monovalentes (conocido como Fv de cadena simple (scFv); ver, *p. ej.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Osbourn *et ál.* 1998, *Nature Biotechnology* 16: 778). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena simple queden comprendidos dentro de la expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo.

Cualesquiera secuencias de VH y VL de scFv específico se pueden enlazar a ADNc de región constante de inmunoglobulina o secuencias genómicas, para generar vectores de expresión que codifican polipéptidos de IgG completos u otros isotipos. También se pueden usar VH y VL en la generación de fragmentos Fab, Fv u otros de inmunoglobulinas al usar tecnología de química proteica o ADN recombinante. Otras formas de anticuerpos de cadena simple, tales como los diacuerpos, también están comprendidas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica simple, pero con el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir que se emparejen los dos dominios en la misma cadena, forzando así que los dominios se emparejen con dominios complementarios en otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (ver, *p. ej.*, Holliger *et ál.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448; Poljak *et ál.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Adicionalmente, un anticuerpo o porción de unión a antígeno de este puede ser parte de polipéptidos de inmuno adhesión más grandes, formados por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos distintos. Los ejemplos de dichos polipéptidos de inmuno adhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para producir un polipéptido de scFv tetramérico (Kipriyanov *et ál.* (1995)

Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo cisteína, un péptido de subunidad de proteína y una etiqueta de polihistidina en el extremo C para producir polipéptidos de scFv bivalentes y biotinilados (Kipriyanov *et ál.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Se pueden preparar porciones de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, digestión de papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, porciones de anticuerpo y polipéptidos de inmunoadhesión se pueden obtener al usar técnicas de ADN recombinante estándares, como se describen en la presente.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenógenos, alógenos o singénicos; o formas modificadas de estos (p. ej. humanizados, quiméricos, etc.). Los anticuerpos también pueden ser completamente humanos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen específica y/o selectivamente o sustancialmente específica y/o selectivamente a un péptido y/o un complejo de MHC-péptido descrito en la presente. Las expresiones «anticuerpos monoclonales» y «composición de anticuerpo monoclonal», según se usa en la presente, se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpo que contienen solo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de hacer inmunorreacción con un epítipo particular de un antígeno, mientras que la expresión «anticuerpos policlonales» y «composición de anticuerpo policlonal» se refiere a una población de polipéptidos de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpo monoclonal típicamente exhibe una afinidad de unión única para un antígeno particular con el cual hace inmunorreacción.

De manera similar a otros restos de unión descritos en la presente, los anticuerpos también pueden estar «humanizados», que pretenden incluir anticuerpos hechos por una célula no humana que tiene regiones variables y constantes que han sido alteradas para parecerse más a anticuerpos hechos por una célula humana. Por ejemplo, al alterar la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos no humanos para incorporar aminoácidos que se encuentran en secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro/ex vivo* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. La expresión «anticuerpo humanizado», tal como

se utiliza en la presente, también incluye anticuerpos en los que se injertaron en secuencias marco humanas secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero. En algunas modalidades, las proteínas de unión descritas en la presente pueden comprender un receptor de células T (TCR), un fragmento de unión al antígeno de un TCR o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas modalidades, la proteína de unión descrita en la presente puede comprender dos cadenas de polipéptidos, cada una de las cuales comprende una región variable que comprende una CDR3 de una cadena alfa de TCR y una CDR3 de una cadena beta de TCR, o una CDR1, CDR2, y CDR3 de una cadena alfa de TCR y una cadena beta de TCR. En algunas modalidades, una proteína de unión comprende un TCR de cadena simple (scTCR), que comprende tanto los dominios V_α de TCR como V_β de TCR, pero solo un dominio constante de TCR individual (C_α o C_β). La expresión «receptor de antígeno quimérico» (CAR) se refiere a una proteína de fusión que se modifica para contener dos o más secuencias de aminoácidos de origen natural unidas entre sí de una manera que no se produce de forma natural o no se produce de forma natural en una célula hospedadora, cuya proteína de fusión puede funcionar como un receptor cuando está presente en una superficie de una célula. Los CAR abarcados por la presente invención pueden incluir una porción extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno (es decir, obtenido o derivado de una inmunoglobulina o molécula de tipo inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o TCR, o un dominio de unión al antígeno derivado u obtenido de un inmunorreceptor aniquilador de una célula NK) enlazado a un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular (que contienen opcionalmente dominios coestimulantes) (ver, por ejemplo, Sadelain et ál. (2013) *Cancer Discov.* 3:388, Harris y Kranz (2016) *Trends Pharmacol. Sci.* 37:220, y Stone et ál. (2014) *Cancer Immunol. Immunother.* 63:1163).

En algunas modalidades, 1) la CDR de cadena alfa del TCR, dominio V_α del TCR, y/o cadena alfa del TCR se encuentran codificados por los genes TRAV, TRAJ y/o TRAC o un fragmento de estos, que se seleccionan del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC enumerados en la Tabla 2, y/o 2) la CDR de cadena beta del TCR, un dominio V_β del TCR y/o cadena beta del TCR se encuentran codificados por los genes TRBV, TRBJ y/o TRBC o un fragmento de estos, que se seleccionan del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC enumerados en la Tabla 2, y/o 3) cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, eliminaciones de aminoácidos, o una combinación de estas en comparación con la secuencia de CDR de

referencia afín enumerada en la Tabla 2.

En algunas modalidades, las proteínas de unión (por ejemplo, el TCR, fragmento de unión al antígeno de un TCR o receptor de antígeno quimérico (CAR)) descritas en la presente son quiméricas (por ejemplo, comprenden residuos de aminoácidos o motivos de más de un donante o especie), humanizadas (por ejemplo, comprenden residuos de un organismo no humano que se alteran o sustituyen para reducir el riesgo de inmunogenicidad en un humano) o humanas.

Los métodos para producir proteínas de unión modificadas, tal como TCR, CAR y fragmentos de unión al antígeno de estos, son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Bowerman et ál. (2009) *Mol. Immunol.* 5:3000; patente estadounidense n.º 6,410,319; patente estadounidense n.º 7,446,191; publicación de patente estadounidense n.º 2010/065818; patente estadounidense n.º 8,822,647; publicación PCT n.º WO 2014/031687; patente estadounidense n.º 7,514,537; y Brentjens et ál. (2007) *Clin. Cancer Res.* 73:5426).

En algunas modalidades, la proteína de unión descrita en la presente es un TCR, o un fragmento de unión al antígeno de este, expresado en una superficie celular, donde el TCR expresado en la superficie celular es capaz de asociarse de manera más eficiente con una proteína CD3 en comparación con el TCR endógeno. Una proteína de unión abarcada por la presente invención, tal como un TCR, cuando se expresa en la superficie de una célula tipo célula T, también puede tener una mayor expresión de superficie en la célula en comparación con una proteína de unión endógena, tal como un TCR endógeno. En algunas modalidades, en la presente se proporciona un CAR, donde el dominio de unión del CAR comprende un dominio de unión a TCR específico del antígeno (ver, por ejemplo, Walseng et ál. (2017) *Scientific Reports* 7:10713).

También se proporcionan proteínas de unión modificadas (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión al antígeno de TCR o CAR) que se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos usando una proteína de unión que tiene una o más de las secuencias V_α y/o V_β descritas en la presente como material de inicio para modificar una proteína de unión modificada que puede tener propiedades alteradas de la proteína de unión de inicio. Una proteína de unión se puede modificar mediante modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_α y/o V_β), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicionalmente o de manera

alternativa, una proteína de unión se puede modificar mediante modificación de residuos dentro de la región o regiones constantes.

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones V_α y/o V_β CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar de ese modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) de la proteína de unión de interés. Se puede realizar mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir una o más mutaciones y el efecto sobre la unión a proteínas, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* como se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. En algunas modalidades, se pueden introducir modificaciones conservadoras (como se analizó anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. En algunas modalidades, las mutaciones son sustituciones. Además, habitualmente no se modifican más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

En algunas modalidades, las proteínas de unión (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión al antígeno de TCR o CAR) descritas en la presente pueden poseer una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos con respecto a un TCR de origen natural. En algunas modalidades, cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, eliminaciones de aminoácidos o una combinación de estas en comparación con la secuencia de CDR de referencia afín enumerada en la Tabla 2. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son bien conocidas y pueden producirse de forma natural o pueden introducirse cuando la proteína de unión se produce de forma recombinante. Las sustituciones, eliminaciones y adiciones de aminoácidos se pueden introducir en una proteína utilizando métodos de mutagénesis conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et ál. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY). Los procedimientos de mutagénesis específicos del sitio (o específicos del segmento) y dirigidos a oligonucleótidos pueden emplearse para proporcionar un polinucleótido alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, eliminación o inserción deseada. De manera alternativa, pueden usarse técnicas de mutagénesis aleatorias o de saturación, tales como la mutagénesis de escaneo de alanina, mutagénesis de reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores y mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para preparar variantes de polipéptido inmunógeno (véase, por ej., Sambrook et ál. supra).

Una variedad de criterios conocidos por los expertos en la técnica indica si un aminoácido que está sustituido en una posición particular en un péptido o polipéptido es conservador (o similar). Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos similares o aminoácidos conservadores es una donde un residuo de aminoácidos se remplaza con un residuo de aminoácidos que tenga una

5 cadena lateral similar. Los aminoácidos similares pueden incluirse en las siguientes categorías: aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ej., lisina, arginina, histidina); aminoácidos con cadenas laterales ácidas (por ej., ácido aspártico, ácido glutámico); aminoácidos con cadenas laterales polares no cargadas (por ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, histidina); aminoácidos con cadenas laterales no polares (por ej., alanina,

10 valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); aminoácidos con cadenas laterales beta-ramificadas (por ej., treonina, valina, isoleucina) y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ej., tirosina, fenilalanina, triptófano). La prolina, que es considerada más difícil de clasificar, comparte propiedades con aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas (por ej., leucina, valina, isoleucina y alanina). En algunas

15 modalidades, la sustitución de glutamina por ácido glutámico o asparagina por ácido aspártico puede considerarse una sustitución similar en que glutamina y asparagina son derivados de amida de ácido glutámico y ácido aspártico, respectivamente. Tal como se entiende en la técnica la «similitud» entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sustitutos de aminoácidos conservadas de estos del polipéptido a la secuencia

20 de un segundo polipéptido (por ej., usando GENEWORKS™, Align, el algoritmo BLAST, u otros algoritmos descritos en la presente y practicados en la técnica).

En algunas modalidades, una proteína de unión codificada (por ejemplo, TCR, fragmento de unión al antígeno de un TCR o CAR) puede comprender un «péptido de señal» (también conocido como una secuencia líder, péptido líder o péptido de tránsito). Los péptidos de señal

25 dirigen polipéptidos recién sintetizados a su ubicación apropiada dentro o fuera de la célula. Un péptido señal se puede retirar del polipéptido durante o una vez que se completa la localización o secreción. Los polipéptidos que tienen un péptido señal se refieren en la presente como una «preproteína» y los polipéptidos que tienen su péptido señal retirado se refieren en la presente como proteínas o polipéptidos «maduros». En algunas modalidades,

30 una proteína de unión (por ejemplo, TCR, fragmento de unión al antígeno de un TCR o CAR) descrita en la presente comprende un dominio V_{α} maduro, un dominio V_{β} maduro o ambos. En

algunas modalidades, una proteína de unión (por ejemplo, TCR, fragmento de unión al antígeno de un TCR o CAR) descrita en la presente comprende una cadena α de TCR madura, una cadena β de TCR madura o ambas.

En algunas modalidades, las proteínas de unión son proteínas de fusión que comprenden: (a)

- 5 un componente extracelular que comprende un TCR o fragmento de unión al antígeno de este; (b) un componente intracelular que comprende un dominio efector o una porción funcional de este; y (c) un dominio transmembrana que conecta los componentes extracelulares e intracelulares. En algunas modalidades, la proteína de fusión es capaz de unirse (por ejemplo, específica y/o selectivamente) a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un
- 10 péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula de MHC de clase I).

Como se usa en la presente, un «dominio efector» o «dominio efector inmunitario» es una porción o dominio intracelular de una proteína o receptor de fusión que puede promover directa o indirectamente una respuesta inmunitaria en una célula cuando recibe una señal apropiada.

- 15 En algunas modalidades, un dominio efector es de una proteína de célula inmunitaria o porción de esta o complejo de proteína de célula inmunitaria que recibe una señal cuando se une (por ejemplo, CD3 ζ), o cuando la proteína de célula inmunitaria o porción de esta o complejo de proteína de célula inmunitaria se une directamente a una molécula diana y activa la transducción de señales del dominio efector en una célula inmunitaria.

- 20 Un dominio efector puede promover directamente una respuesta celular cuando contiene uno o más dominios o motivos de señalización, tal como un motivo de activación basado en tirosina intracelular (ITAM), tal como los encontrados en moléculas coestimulantes. Sin desear limitarse por la teoría, se cree que los ITAM son útiles para la activación de células T después del acoplamiento del ligando por un receptor de células T o por una proteína de fusión que
- 25 comprende un dominio efector de células T. En algunas modalidades, el componente intracelular o porción funcional de este comprende un ITAM. Los dominios efectores inmunitarios de ejemplo incluyen, pero no se limitan a aquellos de, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 ζ , CD25, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcR α , FcR β , FcR γ , Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, Wnt, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76,
- 30 pT α , TCR α , TCR β , TRIM, Zap70, PTCH2, o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, un dominio efector comprende un dominio de señalización del receptor de

linfocitos (por ejemplo, CD3 ζ o una porción funcional o variante de este).

En modalidades adicionales, el componente intracelular de la proteína de fusión comprende un dominio coestimulante o una porción funcional de este seleccionado de CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD2, CD5, ICAM-I (CD54), LFA-I (CD11a/CD18), ICOS (CD278), GITR, CD30, CD40, BAFF-R, HVEM, LIGHT, MKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, un ligando que se une (por ejemplo, específica y/o selectivamente) con CD83, o una variante funcional de este, o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el componente intracelular comprende un dominio coestimulante de CD28 o una porción funcional o variante de este (que puede incluir opcionalmente una mutación LL-GG en las posiciones 186-187 de la proteína CD28 nativa (por ejemplo, Nguyen et ál. (2003) Blood 702:4320), un dominio coestimulante de 4-1BB o una porción funcional o variante de este, o ambos.

En algunas modalidades, un dominio efector comprende un endodominio CD3 ϵ o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD27 o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD28 o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio 4-1BB o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio OX40 o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD2 o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD5 o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio ICAM-I o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio LFA-I o una porción funcional (por ejemplo, señalización) de este, o una variante funcional de este. En modalidades adicionales, un dominio efector comprende un endodominio ICOS o una porción funcional (por ejemplo,

señalización) de este, o una variante funcional de este.

Un componente extracelular y un componente intracelular abarcados por la presente invención se conectan mediante un dominio transmembrana. Un «dominio transmembrana», como se usa en la presente, es una porción de una proteína transmembrana que se puede insertar en o abarcar una membrana celular. Los dominios transmembrana tienen una estructura tridimensional que es termodinámicamente estable en una membrana celular y en general varían en longitud de aproximadamente 15 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos. La estructura de un dominio transmembrana puede comprender una hélice alfa, un barril beta, una lámina beta, una hélice beta o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, el dominio transmembrana comprende o deriva de una proteína transmembrana conocida (por ejemplo, un dominio transmembrana CD4, un dominio transmembrana CD8, un dominio transmembrana CD27, un dominio transmembrana CD28 o cualquier combinación de estos). En algunas modalidades, el componente extracelular de la proteína de fusión comprende además un enlazador dispuesto entre el dominio de unión y el dominio transmembrana. Como se usa en la presente cuando se hace referencia a un componente de una proteína de fusión que conecta los dominios de unión y transmembrana, un «enlazador» puede ser una secuencia de aminoácidos que tiene de aproximadamente dos aminoácidos a aproximadamente 500 aminoácidos, que puede proporcionar flexibilidad y espacio para el movimiento conformacional entre dos regiones, dominios, motivos, fragmentos o módulos conectados mediante el enlazador. Por ejemplo, un enlazador abarcado por la presente invención puede posicionar el dominio de unión lejos de la superficie de una célula hospedadora que expresa la proteína de fusión para permitir el contacto adecuado entre la célula hospedadora y una célula diana, la unión al antígeno y activación (Patel et ál. (1999) *Gene Therapy* 6:412-419). La longitud del enlazador puede variar para maximizar el reconocimiento del antígeno con base en la molécula diana seleccionada, el epítipo de unión seleccionado o el dominio de unión al antígeno y la afinidad (ver, por ejemplo, Guest et ál. (2005) *Immunother.* 28:203-11 y Publ. PCT n.º WO 2014/031687). Los enlazadores de ejemplo incluyen aquellos que tienen una cadena de aminoácidos de glicina-serina que tiene de una a aproximadamente diez repeticiones de Gly_xSer_y, donde x e y son cada uno independientemente un número entero de 0 a 10, siempre que x e y no sean ambos 0 (por ejemplo, (Gly₄Ser)₂, (Gly₃Ser)₂, Gly₂Ser, o una combinación de estos, tal como ((Gly₃Ser)₂Gly₂Ser)).

Una proteína de unión se puede conjugar con un agente, tal como un resto de detección, radiosensibilizador, fotosensibilizador y similares, y/o se pueden modificar químicamente como se describió anteriormente con respecto a los péptidos.

En cualquiera de las modalidades descritas en la presente, la proteína de unión codificada es capaz de unirse a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico de MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula de MHC de clase I).

Una variedad de ensayos es bien conocida por valorar la afinidad de unión y/o determinar si una molécula de unión se une (por ejemplo, específica y/o selectivamente) a un ligando particular (por ejemplo, complejo de antígeno peptídico-MHC). Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar la afinidad de unión de una proteína de unión para una diana, tal como un epítipo peptídico de células T de un polipéptido diana, tal como al usar cualquiera de varios ensayos de unión que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, se puede usar una máquina Biacore™ para determinar la constante de unión de un complejo entre dos proteínas. La constante de disociación (K_D) para el complejo se puede determinar al monitorear los cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo conforme se hace pasar el amortiguador sobre el chip. Otros ensayos adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos tal como ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y radioinmunoabsorción (RIA), o determinación de la unión al monitorear el cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de las proteínas a través de fluorescencia, absorción UV, dicroísmo circular o resonancia magnética nuclear (NMR). Otros ensayos de ejemplo incluyen, de modo no taxativo, transferencia Western, ELISA, ultracentrifugación analítica, espectroscopía y análisis de resonancia de plasmones de superficie (Biacore™) (ver, por ejemplo, Scatchard et ál. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; Wilson (2002) *Science* 295:2103; Wolff et ál. (1993) *Cancer Res.* 53:2560, y patentes estadounidenses n.º 5,283,173 y 5,468,614), citometría de flujo, secuenciación y otros métodos para la detección de ácidos nucleicos expresados. En un ejemplo, la afinidad evidente para una diana se mide al valorar la unión a diferentes concentraciones de tetrámeros, por ejemplo, por citometría de flujo usando multímeros etiquetados, tales como tetrámeros de MHC-antígeno. En un ejemplo representativo, la K_D aparente de una proteína de unión se mide usando diluciones de 2 veces de tetrámeros marcados en un intervalo de concentraciones,

seguido de la determinación de las curvas de unión por regresión no lineal, determinándose la K_D aparente como la concentración de ligando que produjo la mitad de la unión máxima.

VI. Ácidos nucleicos y vectores

- 5 En un aspecto abarcado por la presente invención, en la presente se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas descritas en la presente, tales como péptidos inmunogénicos de MAGEA1 y fragmentos de estos, moléculas de MHC, proteínas de unión (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión al antígeno de los TCR, CAR y similares), y similares. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico se hibrida, en condiciones rigurosas,
10 con el complemento de una secuencia con al menos aproximadamente al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad, tal como a lo largo de la longitud completa, a un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptido enumeradas en las Tablas 1-3.
- 15 En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico se hibrida, en condiciones rigurosas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en secuencias de polipéptidos enumeradas en las Tablas 1-3.
En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente en, o consiste en) una secuencia de nucleótidos que codifica un
20 polipéptido seleccionado del grupo que consiste en secuencias de polipéptidos enumeradas en las Tablas 1-3.
En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico codifica péptidos inmunogénicos de MAGEA1 descritos en la presente.
En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden,
25 consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de cadena α de TCR que se muestra en la Tabla 2. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_α de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos
30 aproximadamente al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una

secuencia de dominio V_{α} de TCR expuesta en la Tabla 2. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena α de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una secuencia de cadena α de TCR expuesta en la Tabla 2.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de cadena β de TCR que se muestra en la

Tabla 2. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_{β} de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una

secuencia de dominio V_{β} de TCR expuesta en la Tabla 2. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena β de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad con una secuencia de cadena β de TCR expuesta en la Tabla 2.

La expresión «ácido nucleico» incluye «polinucleótido», «oligonucleótido» y «molécula de ácido nucleico», y en general significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser de cadena individual o de cadena doble, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace de internucleótido natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosfoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido sin modificar. En una modalidad, el ácido nucleico comprende ADN complementario (ADNc).

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos abarcados por la presente invención son recombinantes. Como se utiliza en la presente, el término «recombinante» se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivas por la unión de segmentos de ácido

nucleico naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que se pueden replicar en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de aquellas descritas en (i) anteriormente. Para los fines de la presente, la replicación puede ser replicación in vitro, ex vivo o replicación in vivo.

- 5 Los ácidos nucleicos se pueden construir con base en reacciones de ligadura enzimática y/o síntesis química utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook et ál. supra. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos que se presentan naturalmente o nucleótidos diversamente modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la
- 10 estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) -uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-
- 15 carboximetilaminotiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopentiladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N⁶-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxiberboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopentiladenina, ácido uracil-5-
- 20 oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos abarcados por la presente invención se pueden comprar de empresas, tal como Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).
- 25 En una modalidad, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos optimizada por codones. Sin limitarse a una teoría o mecanismo particular, se cree que la optimización por codones de la secuencia de nucleótidos incrementa la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización por codones de la secuencia de nucleótidos puede implicar la sustitución de un codón natural por otro codón que codifica para el mismo
- 30 aminoácido, pero se puede traducir por ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, incrementando de esta manera la eficiencia de traducción. La optimización de la

secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras de ARNm secundarias que interferirían con la traducción, incrementando de esta manera la eficiencia de traducción. En algunas modalidades, las secuencias de nucleótidos descritas en la presente se optimizan por codones para la expresión en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula inmunitaria, tal como una célula T).

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones estrictas a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente.

La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones estrictas se puede hibridar bajo condiciones de alto rigor. Por «condiciones muy rigurosas» se entiende que la secuencia de nucleótidos se hibrida específica y/o selectivamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones muy rigurosas incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o una que contiene sólo unos pocos desajustes dispersos de una secuencia aleatoria que sucede que tiene unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidieron con la secuencia de nucleótidos. Estas pequeñas regiones de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alto rigor las hace fácilmente distinguibles. Condiciones de relativamente muy rigurosas incluirían, por ejemplo, condiciones de sal baja y/o alta temperatura, tal como se proporciona por aproximadamente 0,02-0,1 M de NaCl o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Estas condiciones muy rigurosas toleran poco, si lo hay, desajuste entre la secuencia de nucleótidos y la cadena diana o plantilla, y son en particular adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR inventivos. En general, se aprecia que las condiciones se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a

cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente.

Habitualmente, este ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que se puede incluir en un vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

- 5 Los términos «vector», «vector de clonación» y «vector de expresión» significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Por lo tanto, un objeto adicional abarcado por la presente invención se refiere a un vector que comprende un ácido
- 10 nucleico abarcado por la presente invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho polipéptido después de la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para la célula animal incluyen promotor precoz y potenciador de

15 SV40 (Mizukami T. et ál. 1987), promotor y potenciador de LTR de virus de la leucemia del ratón Moloney (Kuwana Y et ál. 1987), promotor (Mason J O et ál. 1985) y potenciador (Gillies S, D et ál. 1983) de cadena H de inmunoglobulina y similares.

Se puede usar cualquier vector de expresión para una célula animal. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et ál. 1990), pAGE103 (Mizukami T et ál. 1987),

20 pHSG274 (Brady G et ál. 1984), pKCR (O'Hare K et ál. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H et ál. 1990) y similares. Otros ejemplos representativos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integradores, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares. Los ejemplos representativos de vector viral incluyen vectores adenovirales, retrovirales, lentivirales, del virus del herpes y AAV. Dichos virus recombinantes

25 pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tal como mediante la transfección de células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento viral incluyen células PA317, células PsiCRIP, células positivas para GPenv, células 293, etc. Los protocolos detallados para la producción de tales virus recombinantes con replicación defectuosa son

30 conocidos y pueden encontrarse, por ejemplo, en la Publ. PCT WO 95/14785, Publ. PCT WO 96/22378, patente estadounidense n.º 5,882,877, patente estadounidense n.º 6,013,516,

patente estadounidense n.º 4,861,719, patente estadounidense n.º 5,278,056, y Publ. PCT WO 94/19478.

En algunas modalidades, el vector de expresión es un nanoplásmido. El término «nanoplásmido» usado en la presente hace referencia a una secuencia de ADN circular que

5 tiene una secuencia bacteriana reducida que proporciona un plásmido más pequeño con una inserción génica deseada. El tamaño reducido del vector está asociado con toxicidad inducida por ADN limitada luego de la transfección, duración potencialmente mayor en las células, viabilidad potencialmente mejor luego de la transfección y eficacia de transposición potencialmente superior. En algunas modalidades, el nanoplásmido es un nanoplásmido sin

10 marcador de resistencia a antibióticos. En algunas modalidades, el nanoplásmido comprende un marcador de selección y/o un marcador supresor sin sentido. Debido al tamaño pequeño de la estructura principal, por ejemplo, <500 bp de estructura principal, dichos nanoplásmidos maximizan el tamaño de la inserción génica deseada. La inserción génica deseada (por ejemplo, un transgén eucariota) puede tener cualquier tamaño que pueda administrarse a

15 células diana, por ejemplo, hasta 50 kb, 45 kb, 40 kb, 35 kb, 30 kb, 25 kb, 20 kb, 18 kb, 15 kb, 12 kb, 10 kb, 5,0 kb, 4,5 kb, 4,0 kb, 3,5 kb, 3,0 kb, 2,8 kb, 2,5 kb, 2,2 kb, 2 kb, 1,8 kb, 1,5 kb, 1,2 kb, 1 kb, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como 8-12 kb. También proporcionan expresión de transgenes elevada y reducen el silenciamiento de transgenes, con una eficacia de integración sintonizable de la carga asociada con la integración aleatoria de la

20 carga en el genoma de las células modificadas.

En algunas modalidades, el nanoplásmido puede comprender elementos que se muestran en vectores proporcionados en la Tabla 3 (por ejemplo, R6K y RNA-OUT). Por ejemplo, en algunas modalidades, un nanoplásmido comprende un origen de replicación ColE1 o R6K bacteriano minimizado (que hace que dichos nanoplásmidos sean replicables en una cepa

25 hospedadora bacteriana), un marcador seleccionable (por ejemplo, un marcador seleccionable de ARN bacteriano) y una región génica eucariota. Un marcador seleccionable de ARN es un ARN no traducido expresado transmitido por vector que regula un gen diana expresado en el cromosoma para proporcionar la selección del vector. Este puede ser un ARNt de supresión sin sentido transmitido por plásmido que regula una diana cromosómica seleccionable

30 suprimible sin sentido, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6,977,174 e incorporada a la presente mediante referencia. Este también puede ser un ARN represor

- antisentido transmitido por plásmido, un gen RNA-OUT que reprime dianas reguladas por RNA-IN, RNAI codificado por origen de plásmido pMB1 que reprime dianas reguladas por RNAII, RNAI codificado por origen pMU720 de plásmido IncB que reprime dianas reguladas por RNA II, locus ParB Sok de plásmido RI que reprime dianas reguladas por Hok, locus Flm
- 5 FlmB de plásmido F que reprime dianas reguladas por flmA, un ARN represor antisentido natural tal como los descritos en, por ejemplo, Wagner *et ál.* (2002) *Adv. Genet.* 46:361 y Franch y Gerdes (2000) *Current Opin. Microbiol.* 3:159, o un ARN represor modificado, tal como un ARN pequeño sintético como andamiajes SgrS, MicC o MicF como se describe en Park *et ál.* (2013) *Nature Biotechnology* 31:170-174.
- 10 Los ejemplos de nanoplásmidos producidos por un sistema de selección RNA-OUT sin antibiótico y métodos de preparación de dichos nanoplásmidos se describen en, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2008153733, la patente estadounidense n.º 9,737,620, la publicación de patente estadounidense n.º 2010/0303859 y la patente estadounidense n.º 9,109,012, que se incorporan en su totalidad mediante referencia. Ejemplos de nanoplásmidos
- 15 adicionales se describen en, por ejemplo, la solicitud PCT n.º PCT/US2013/000259, PCT/US2013/00067 y PCT/US2013/00068, y la publicación de patente estadounidense n.º 2015/0275221, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.
- Los nanoplásmidos se encuentran disponibles comercialmente. Por ejemplo, Nature
- 20 Technology Corporation, una filial de Aldevron, proporciona vectores de nanoplásmidos que combinan un marcador seleccionable de ARN con un origen de replicación relacionado con R6K, ColE2 o ColE2. Estos vectores de nanoplásmidos incluyen, por ejemplo, vectores NTC9385C, NTC9685C, NTC9385R, NTC9685R, así como modificaciones de estos, tales como aquellos descritos en la solicitud PCT n.º PCT/US2013/00068; vectores NTC9385R-BE,
- 25 NTC9385Ra-O1 y NTC9385Ra-O2, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 10,144,935; y vectores minicirculares replicativos NTC9385C2, NTC9385C2a, NTC9385R2, NTC9385R2a, NTC9385R2b, NTC9385Ra, NTC9385RaF y NTC9385RbF como los descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 2021/0189407, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.
- 30 En algunas modalidades, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína de unión o un polipéptido descrito en la

presente o un fragmento de este. En algunas modalidades, el ácido nucleico incluye elementos reguladores necesarios para la expresión del marco de lectura abierto. Dichos elementos pueden incluir, por ejemplo, un promotor, un codón de inicio, un codón de terminación y una señal de poliadenilación. Además, se pueden incluir potenciadores. Estos elementos se

5 pueden enlazar de manera operativa a una secuencia que codifica la proteína de unión, el polipéptido o fragmento de este.

En algunas modalidades, el vector comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica CD8 α , CD8 β , un receptor de TGF β negativo dominante (por ejemplo, un DN-TGF β RII), marcador de proteína seleccionable, opcionalmente donde el marcador de proteína

10 seleccionable es dihidrofolato reductasa (DHFR). En determinadas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica CD8 α , CD8 β , el DN-TGF β R y/o el marcador de proteína seleccionable está unido de manera operativa a un ácido nucleico que codifica una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta de enriquecimiento CD34). En modalidades específicas, una

15 secuencia de ácido nucleico descrita en la presente, tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica un TCR α , TCR β , CD8 α , CD8 β , DN-TGF β R, y/o el marcador de proteína seleccionable se interconectan con un sitio de entrada de ribosoma interno o una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido auto-escindible, tal como P2A, E2A, F2A o T2A, etc.

En algunas modalidades, el vector de expresión proporcionado en la presente comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

20 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos establecidos en las Tablas 1-3.

Como se describió anteriormente, los ejemplos representativos de promotores incluyen, de modo no taxativo, promotores del virus de simio 40 (SV40), promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor de

25 repetición terminal larga (LTR) de VIH, virus de Moloney, citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de CMV, virus de Epstein Barr (EBV), virus de sarcoma de Rous (RSV) así como promotores de genes humanos tal como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana. Los ejemplos de

30 señales de poliadenilación adecuadas incluyen, pero no se limitan a, señales de poliadenilación de SV40 y señales de poliadenilación de LTR.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión, también se pueden incluir

otros elementos en la molécula de ácido nucleico. Estos elementos adicionales incluyen potenciadores. Los potenciadores incluyen los promotores descritos en la presente. En algunas modalidades, los potenciadores/promotores incluyen, por ejemplo, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y potenciadores virales tal como los de CMV, RSV y EBV.

En algunas modalidades, el ácido nucleico se puede incorporar operativamente en un portador o vector de distribución como se describe más adelante. Los vectores de distribución útiles incluyen, pero no se limitan a, microcápsulas biodegradables, complejos inmunoestimulantes (ISCOM) o liposomas, y portadores vivos atenuados por modificación tal como virus o bacterias.

En algunas modalidades, el vector es un vector viral, tal como lentivirus, retrovirus, virus de herpes, adenovirus, virus adenoasociados, virus de vaccinia, baculovirus, viruela aviar, viruela AV, vaccinia Ankara modificada (MVA) y otros virus recombinantes. Por ejemplo, se puede usar un vector de lentivirus para infectar células T.

En algunas modalidades, el vector de expresión recombinante es capaz de administrar un polinucleótido a una célula hospedadora apropiada, por ejemplo, una célula T o una célula presentadora de antígeno, es decir, una célula que presenta un complejo de péptido/MHC en su superficie celular (por ejemplo, una célula dendrítica) y carece de CD8. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula progenitora hematopoyética o una célula del sistema inmunitario humano. Por ejemplo, la célula del sistema inmunitario puede ser una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺, una célula T CD4/CD8 doble negativa, una célula T gd, una célula aniquiladora natural, una célula dendrítica o cualquier combinación de estas. En algunas modalidades, donde una célula T es el hospedador, la célula T puede ser sin tratamiento previo, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o cualquier combinación de estas. Por lo tanto, los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir, por ejemplo, elementos reguladores transcripcionales específicos de tejido linfóide (TRE), tal como un linfocito B, linfocito T o TRE específicos de células dendríticas. Los TRE específicos de tejido linfóide se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Thompson et ál. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 72:1043, Todd et ál. (1993) *J. Exp. Med.* 777:1663, y Penix et ál. (1993) *J. Exp. Med.* 775:1483).

En algunas modalidades, un vector de expresión recombinante comprende una secuencia de

nucleótidos que codifica para una cadena α de TCR, una cadena β de TCR y/o un péptido enlazador. Por ejemplo, en algunas modalidades, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas TCR alfa y TCR beta de longitud completa de la proteína de unión con un ligador colocado entre ellas, en donde la

5 secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena beta se coloca 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos codifica para las cadenas de TCR alfa y TCR beta de longitud completa con un ligador colocado entre ellas, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena

10 beta de TCR se coloca en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica para la cadena alfa de TCR. En algunas modalidades, las cadenas TCR alfa y/o TCR beta de longitud completa se reemplazan con fragmentos de estas.

Como se describe adicionalmente a continuación, otro aspecto abarcado por la presente invención se refiere a una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la presente invención. Una célula hospedadora

15 puede incluir cualquier célula individual o cultivo celular que pueda recibir un vector o la incorporación de ácidos nucleicos y/o proteínas, así como cualquier célula de progenie. El término también abarca la progenie de la célula hospedadora, ya sea genética o fenotípicamente la misma o diferente. Las células hospedadoras adecuadas pueden depender del vector y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de

20 simio, células de insecto, células de levadura y células bacterianas. Estas células se pueden inducir para incorporar el vector u otro material mediante el uso de un vector viral, transformación mediante precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección u otros métodos (ver, por ejemplo, Sambrook et ál. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2a ed. (Cold Spring Harbor Laboratory)). El término «transformación»

25 significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN «extraño» (es decir, extrínseco o extracelular) en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora exprese el gen o la secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducidos. Una célula hospedadora que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido «transformada».

30 Por ejemplo, en algunas modalidades, las células inmunitarias modificadas (por ejemplo, células T) pueden comprender células pan T (tanto células T CD4⁺ como CD8⁺) modificadas

mediante administración de genes mediada por transposones/transposasa para expresar una carga genética que codifique elementos tales como las cadenas alfa y beta de un receptor de células T (TCR) recombinante específico para un antígeno diana determinado presentado en un MHC particular (por ejemplo, HLA de clase I). El vector puede expresar elementos adicionales, tales como uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en a) correceptores de CD8 α y CD8 β para permitir el acoplamiento de células T CD4 $^{+}$; b) una etiqueta de epítipo QBEND/10 derivada de Cd34 fusionada con el extremo amino de CD8 α para permitir el rastreo de células manipuladas in vitro e in vivo; c) un receptor de TGF β de tipo II negativo dominante (DN-TGF β RII) para superar la supresión inmunitaria mediada por tumor; y d) un marcador de selección, tal como una forma mutada de dihidrofolato reductasa (DHFRdm) para facilitar el enriquecimiento de células modificadas durante el proceso de fabricación. Las cadenas α y β del TCR exógeno y las cadenas α y β de CD8 pueden estar codificadas por una molécula de ARNm simple bajo el control de un promotor simple, tal como el promotor del virus de células madre murinas (MSCV). El procesamiento postraducciona en elementos de péptidos autoescindibles, tales como los sitios P2A, puede generar polipéptidos independientes, de manera de producir los cuatro polipéptidos individuales que corresponden a cada elemento en el vector. De manera similar, DN-TGF β RII y DHFRdm pueden codificarse mediante una molécula de ARNm simple impulsada por un único promotor, tal como el promotor del factor de elongación humano 1 α (EF1 α). El procesamiento postraducciona en elementos de péptidos autoescindibles, tales como los sitios P2A, puede generar polipéptidos independientes, que corresponden a cada elemento individual en el vector.

Los ácidos nucleicos abarcados por la presente invención se pueden usar para producir un polipéptido recombinante abarcado por la presente invención en un sistema de expresión adecuado. El término «sistema de expresión» significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula hospedadora. Los sistemas de expresión comunes incluyen células hospedadoras de *E. coli* y vectores de plásmido, células hospedadoras de insectos y vectores de *Baculovirus*, y células hospedadoras y vectores de mamíferos. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procariotas (tal como bacterias) y células eucariotas (tal como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos

específicos incluyen levaduras de *E. coli*, *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células Cho, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares de mamífero primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las que un gen de dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo denominado «gen DHFR») es defectuoso (Urlaub G et al (1980), células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL 1662, en lo sucesivo denominada «célula YB2/0»), y similares. En algunas modalidades, se usa la célula YB2/0 ya que la actividad de ADCC de proteínas de unión quiméricas o humanizadas aumenta cuando se expresa en esta célula.

La presente invención también abarca métodos para producir una célula hospedadora recombinante que expresa proteínas de unión, péptidos y fragmentos de los mismos abarcados por la presente invención, comprendiendo este método los pasos que consisten en (i) introducir in vitro o ex vivo un ácido nucleico recombinante o un vector como se ha descrito anteriormente en una célula hospedadora competente, (ii) cultivar in vitro o ex vivo la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan estas proteínas de unión, péptidos y fragmentos de estos. Estas células hospedadoras recombinantes se pueden usar para el método diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico abarcado por la presente invención.

En otro aspecto, como se describió anteriormente, la presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que se hibridan en condiciones de hibridación selectiva con un polinucleótido descrito en la presente. Por lo tanto, los polinucleótidos de esta modalidad se pueden usar para aislar, detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden estos polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos abarcados por la presente invención se pueden usar para identificar, aislar o amplificar clones parciales o de longitud completa en una biblioteca depositada. En algunas modalidades, los polinucleótidos son secuencias genómicas o de ADNc aisladas o, de cualquier otra manera, complementarias a un ADNc de una biblioteca de ácido nucleico de humanos o mamíferos. En algunas modalidades, la biblioteca de ADNc comprende al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o

más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como al menos aproximadamente 80%-100%, secuencias de longitud completa. Las bibliotecas de ADNc se pueden normalizar para aumentar la representación de secuencias raras. Se emplean condiciones de hibridación de rigurosidad baja o moderada típicamente, pero no exclusivamente, con secuencias que tienen una identidad de secuencia reducida con respecto a secuencias complementarias. Las condiciones de rigurosidad moderada y alta se pueden emplear, opcionalmente, para secuencias con mayor identidad. Las condiciones de rigurosidad baja permiten la hibridación selectiva de secuencias que tienen aproximadamente 70 % de identidad de secuencia y se pueden emplear para identificar secuencias ortólogas o parálogas. Opcionalmente, los polinucleótidos abarcados por la presente invención codificarán al menos una porción de una proteína de unión codificada por los polinucleótidos descritos en la presente. Los polinucleótidos comprendidos por la presente invención abarcan secuencias de ácido nucleico que se pueden emplear para la hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica para una proteína de unión comprendida por la presente invención (ver, por ejemplo, Ausubel, supra y Colligan, supra).

VII. Células modificadas

En un aspecto abarcado por la presente invención, en la presente se proporcionan células hospedadoras que expresan las proteínas descritas en la presente, tales como péptidos inmunogénicos de MAGEA1, complejos de péptido inmunogénico de MAGEA1-MHC (pMHC), proteínas de unión a MAGEA1 (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión al antígeno de TCR, CAR o proteínas de fusión que comprenden un TCR y un dominio efector) y similares, descritas en la presente. En algunas modalidades, las células hospedadoras comprenden los ácidos nucleicos o vectores descritos en la presente.

En algunas modalidades, se usa un polinucleótido que codifica una proteína de unión para transformar, transfectar o transducir una célula hospedadora (por ejemplo, una célula T) para su uso en terapia de transferencia adoptiva. Se han descrito avances en la secuenciación de ácidos nucleicos y la secuenciación de TCR particular (por ejemplo, Robins et ál. (2009) *Blood* 114:4099; Robins et ál. (2010) *Sci. Translat. Med.* 2:47ra64, Robins et ál. (2011) *J. Imm. Meth.*, y Warren et ál. (2011) *Genome Res.* 21:790) y se puede emplear en el curso de la práctica de las modalidades comprendidas por la presente invención. De manera similar, los métodos para

transfectar o transducir células T con ácidos nucleicos deseados son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º US 2004/0087025) como tienen procedimientos de transferencia adoptivos usando células T de especificidad de antígeno deseada (por ejemplo, Schmitt et ál. (2009) *Hum. Gen.* 20:1240, Dossett et ál. (2009) *Mol. Ther.* 77:742, Till et ál. (2008) *Blood* 772:2261, Wang et ál. (2007) *Hum. Gene Ther.* 18:112, Kuball et ál. (2007) *Blood* 709:2331, publicación de patente estadounidense 2011/0243972, publicación de patente estadounidense 2011/0189141, y Leen et ál. (2007) *Ann. Rev. Immunol.* 25:243).

Cualquier célula inmunitaria adecuada se puede modificar para incluir un polinucleótido heterólogo abarcado por la presente invención, que incluye, por ejemplo, una célula T, una célula NK o una célula NK-T. En algunas modalidades, la célula puede ser una célula primaria o una célula de una línea celular. En algunas modalidades, una célula inmunitaria modificada comprende una célula T CD4⁺, una célula T CD8⁺ o ambas. Con los propósitos de la presente, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivadas, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, incluyendo, pero no limitado a sangre, médula ósea, ganglio linfático, el timo, u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden enriquecer o purificar. En algunas modalidades, la célula T es una célula T humana. En algunas modalidades, la célula T es una célula T aislada de un humano. Las células T pueden ser cualquier tipo de célula T y pueden ser de cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, pero no limitado a, linfocitos citotóxicos, célula precursora de linfocitos citotóxicos, célula progenitora de linfocitos citotóxicos, célula madre de linfocitos citotóxicos, células T doble positivas CD4⁺/CD8⁺, células T auxiliares CD4⁺, por ejemplo, células Th1 y Th2, células T CD4⁺, células T CD8⁺ (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos de infiltración de tumor (TIL), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central y células T de memoria efectoras), células T sin tratamiento previo, y similares.

Se puede usar cualquier método apropiado para transfectar o transducir las células (por ejemplo, células T), o para administrar las secuencias de nucleótidos o composiciones abarcadas por métodos descritos en la presente. Los métodos para administrar polinucleótidos a células hospedadoras incluyen, por ejemplo, el uso de polímeros catiónicos, moléculas de

tipo lípido y ciertos productos comerciales tal como, por ejemplo, in vivo-jetPEI®. Otros métodos incluyen transducción ex vivo, inyección, electroporación, DEAE-dextrano, carga de sonicación, transfección mediada por liposomas, transducción mediada por receptores, bombardeo de microproyectiles, transferencia mediada por transposones y similares. Otros métodos adicionales de transfección o transducción de células hospedadoras emplean vectores, descritos en detalle adicional en la presente.

Las células inmunitarias modificadas como se describe en la presente se pueden caracterizar funcionalmente usando metodologías para ensayar la actividad de células T, incluyendo la determinación de la unión, activación o inducción de células T y también incluyendo la determinación de respuestas de células T que son específicas de antígeno. Los ejemplos incluyen la determinación de la proliferación de células T, la liberación de citocinas de células T, la estimulación de células T específicas de antígeno, la estimulación de células T restringidas por MHC, la actividad de CTL (por ejemplo, detectando la liberación de ⁵¹Cr de células diana precargadas), cambios en la expresión de marcadores fenotípicos de células T y otras medidas de funciones de células T.

Los procedimientos para realizar estos y otros ensayos similares se pueden encontrar, por ejemplo, en Lefkovits (Immunology Methods Manual: Hie Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998), así como Current Protocols in Immunology, Weir, (1986) Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell y Shigii (eds.) (1979) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green y Reed (1998) Science 281:1309, y las referencias citadas en este.

En algunas modalidades, la afinidad aparente por una proteína de unión, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, se puede medir evaluando la unión a diversas concentraciones de multímeros de MHC. «Tinción de multímero de MHC-péptido» se refiere a un ensayo usado para detectar células T específicas de antígeno, que, en algunas modalidades, presenta un tetrámero de moléculas de MHC, comprendiendo cada una un péptido idéntico que tiene una secuencia de aminoácidos que es afín (por ejemplo, idéntica o relacionada con) al menos un antígeno (por ejemplo, un péptido inmunogénico de MAGEA1), en el que el complejo es capaz de unirse a una proteína de unión, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, que reconoce el antígeno afín. Cada una de las moléculas de MHC se puede etiquetar con una molécula de biotina. Los MHC/péptidos biotinilados se

pueden multimerizar (por ejemplo, tetramerizar) mediante la adición de estreptavidina, que se puede marcar fluorescentemente.

El multímero se puede detectar por citometría de flujo a través del marcador fluorescente. En algunas modalidades, se usa un ensayo de multímero de pMHC para detectar o seleccionar proteína de unión de afinidad mejorada, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, abarcado por la presente invención. En algunos ejemplos, la K_D aparente de una proteína de unión, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, se mide usando diluciones de 2 veces de multímeros marcados en un intervalo de concentraciones, seguido de determinación de curvas de unión por regresión no lineal, determinándose la K_D aparente como la concentración de ligando que produjo unión semimáxima.

Los niveles de citocinas se pueden determinar usando métodos descritos en la presente, tal como ELISA, ELISPOT, tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo y combinaciones de los mismos (por ejemplo, tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo).

La proliferación de células inmunitarias y la expansión clonal resultante de una estimulación o inducción específica de antígeno de una respuesta inmunitaria se puede determinar aislando linfocitos, tal como linfocitos circulantes en muestras de células de sangre periférica o células de ganglios linfáticos, estimulando las células con antígeno, y midiendo la producción de citocinas, la proliferación celular y/o la viabilidad celular, tal como por incorporación de timidina tritiada o ensayos no radiactivos, tal como ensayos de MTT y similares. El efecto de un inmunógeno descrito en la presente sobre el equilibrio entre una respuesta inmunitaria Th1 y una respuesta inmunitaria Th2 se puede examinar, por ejemplo, determinando los niveles de citocinas Th1, tal como IFN- γ , IL-12, IL-2 y TNF- β , y citocinas de tipo 2, tal como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.

Una célula hospedadora abarcada por la presente invención puede comprender un polinucleótido individual que codifica para una proteína de unión tal como se describe en la presente, o la proteína de unión se puede codificar por más de un polinucleótido. En otras palabras, los componentes o porciones de una proteína de unión pueden estar codificados por dos o más polinucleótidos, que pueden estar contenidos en una molécula individual de ácido nucleico o pueden estar contenidos en dos o más moléculas de ácido nucleico.

Además, como se describe de manera adicional más adelante en los ejemplos prácticos, una célula hospedadora comprendida por la presente invención puede codificar y/o expresar

proteínas accesorias útiles además de una proteína de unión como se describe en la presente, ya sea en el mismo polinucleótido o en un polinucleótido diferente que la proteína de unión o sus componentes. Por ejemplo, la célula hospedadora puede codificar y/o expresar CD8 α , CD8 β , un DN-TGFR (por ejemplo, un DN-TGF β RII), y/o un marcador de proteína seleccionable, opcionalmente donde el marcador de proteína seleccionable es DHFR.

En algunas modalidades, un polinucleótido que codifica dos o más componentes o porciones de una proteína de unión abarcada por la presente invención comprende las dos o más secuencias codificantes asociadas operativamente en un marco individual de lectura abierto.

Una disposición de este tipo puede permitir ventajosamente la expresión coordinada de productos génicos deseados, tal como, por ejemplo, la expresión contemporánea de cadenas alfa y beta de un TCR, de modo que se producen en una proporción de aproximadamente 1:1.

En algunas modalidades, dos o más productos génicos sustituyentes de una proteína de unión abarcada por la presente invención, tal como un TCR (por ejemplo, cadenas alfa y beta) o CAR, se expresan como moléculas separadas y se asocian post-traduccionalmente. En

modalidades adicionales, dos o más productos de genes sustituyentes de una proteína de unión abarcada por la presente invención se expresan como un péptido individual con las partes separadas por un segmento escindible o removible. Por ejemplo, los péptidos de auto-escisión útiles para la expresión de polipéptidos separables codificados por un polinucleótido individual o vector se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, un péptido de teschovirus porcino-1 2 A (P2A), un péptido de virus de la fiebre aftosa 2A (T2A), un péptido de virus de rinitis equina A (ERAV) 2A (E2A) y un péptido de fiebre aftosa 2A (F2A).

En algunas modalidades, una proteína de unión abarcada por la presente invención comprende uno o más aminoácidos de unión. «Aminoácidos de unión» o «residuos de aminoácidos de unión» se refieren a uno o más (por ejemplo, de 2 a aproximadamente 10)

residuos de aminoácidos entre dos motivos, regiones o dominios adyacentes de un polipéptido, tal como entre un dominio de unión y un dominio constante adyacente o entre una cadena de TCR y un péptido auto-escindible adyacente. Los aminoácidos de unión pueden resultar del diseño de una construcción que codifica para una proteína de fusión (por ejemplo, residuos de aminoácido resultantes del uso de un sitio de enzima de restricción durante la construcción de una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión), o de la escisión de, por ejemplo, un péptido de auto-escisión adyacente a uno o más dominios de una proteína de

unión codificada abarcada por la presente invención (por ejemplo, un péptido P2A dispuesto entre una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, cuya auto-escisión puede dejar uno o más aminoácidos de unión en la cadena α , la cadena β de TCR, o ambos).

Las células inmunitarias modificadas abarcadas por la presente invención se pueden administrar como terapias para, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En algunas circunstancias, puede ser deseable reducir o detener la actividad asociada con una inmunoterapia celular. Por lo tanto, en algunas modalidades, una célula inmunitaria modificada englobada por la presente invención comprende un polinucleótido heterólogo que codifica para una proteína de unión y una proteína accesorio, tal como una proteína de cambio de seguridad, que se puede dirigir usando un fármaco afín u otro compuesto para modular selectivamente la actividad (por ejemplo, disminuir o extirpar) de estas células cuando sea deseable. Las proteínas de cambio de seguridad usadas a este respecto incluyen, por ejemplo, un polipéptido de receptor de EGF truncado (huEGFRt) que está desprovisto de dominios de unión a ligando N-terminal extracelular y actividad de tirosina cinasa de receptor intracelular pero retiene la secuencia de aminoácidos nativa, localización de superficie celular transmembrana de tipo I, y un epítipo de unión conformacionalmente intacto para anticuerpo monoclonal anti-EGFR de grado farmacéutico, receptor de cetuximab (Erbix) tEGF (tEGFr; Wang et ál. (2011) *Blood* 118:1255-1263), un polipéptido de caspasa (por ejemplo, iCasp9; Straathof et ál. (2005) *Blood* 105:4247-4254, Di Stasi et ál. (2011) *N. Engl. J. Med.* 365:1673-1683, Zhou y Brenner (2016) *Hematol. pii:S0301-472X:30513-30516*), RQR8 (Philip et ál. (2014) *Blood* 124:1277-1287), y una etiqueta de proteína c-myc humana (Kieback et ál. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:623-628).

Otros componentes accesorios útiles para células terapéuticas comprenden una etiqueta o marcador de selección (por ejemplo, una etiqueta de enriquecimiento de CD34) que permite que las células se identifiquen, clasifiquen, aíslen, enriquezcan, o rastreen. Por ejemplo, las células inmunitarias marcadas que tienen características deseadas (por ejemplo, un TCR específico de antígeno y una proteína de cambio de seguridad) se pueden separar de las células no marcadas en una muestra y activarse y expandirse de manera más eficiente para su inclusión en un producto terapéutico de pureza deseada.

Como se usa en la presente, el término «marcador de selección» comprende una construcción de ácido nucleico que confiere un cambio identificable a una célula que permite la detección y

selección positiva de células inmunitarias transducidas con un polinucleótido que comprende un marcador de selección. Por ejemplo, RQR es un marcador de selección que comprende un bucle extracelular principal de CD20 y dos sitios mínimos de unión a CD34. En algunas modalidades, un polinucleótido que codifica para RQR comprende un polinucleótido que

5 codifica para el epítipo mínimo de CD34 de 16 aminoácidos. En algunas modalidades, tal como ciertas modalidades proporcionadas en los ejemplos de la presente, el epítipo mínimo de CD34 se incorpora en la posición amino terminal del dominio de tallo de CD8 (Q8). En modalidades adicionales, la secuencia del sitio de unión mínimo de CD34 se puede combinar con un epítipo diana para CD20 para formar un gen marcador/suicida compacto para células

10 T (RQR8) (Philip et ál. 2014). Esta construcción permite la selección de células inmunitarias que expresan la construcción, con, por ejemplo, anticuerpo específico de CD34 unido a cuentas magnéticas (Miltenyi) y que utiliza anticuerpo farmacéutico clínicamente aceptado, rituximab, que permite la delección selectiva de una célula T modificada que expresa transgén (por ejemplo, Philip et ál. (2014) *Blood* 124:1277-1287, publicación de patente estadounidense

15 2015-0093401, y publicación de patente estadounidense 2018-0051089).

Otros marcadores de selección a modo de ejemplo incluyen varias proteínas transmembrana de tipo I truncadas que normalmente no se expresan en células T: el factor de crecimiento nervioso de baja afinidad truncado, CD19 truncado y CD34 truncado (por ejemplo, Di Stasi et ál. (2011) *N. Engl. J. Med.* 365:1673-1683, Mavilio et ál. (1994) *Blood* 83:1988-1997, y Fehse

20 et ál. (2000) *Mol. Ther.* 7:448-456). Una característica particularmente atractiva de CD19 y CD34 es la disponibilidad del sistema de selección Miltenyi CliniMACs™ disponible en el mercado que se puede dirigir a estos marcadores para la clasificación de grado clínico. Sin embargo, CD19 y CD34 son proteínas de superficie relativamente grandes que pueden afectar la capacidad de empaquetamiento del vector y la eficiencia transcripcional de un vector de

25 integración. También se pueden emplear marcadores de superficie que contienen los dominios extracelulares, no señalizadores o diversas proteínas (por ejemplo, CD19, CD34, LNGFR, etc.). Se puede emplear cualquier marcador de selección y debe ser aceptable para buenas prácticas de fabricación. En algunas modalidades, los marcadores de selección se expresan con un polinucleótido que codifica para un producto de gen de interés (por ejemplo, una

30 proteína de unión abarcada por la presente invención, tal como un TCR o CAR, o fragmento de unión a antígeno del mismo). Otros ejemplos de marcadores de selección incluyen, por

ejemplo, reporteros tal como GFP, EGFP, β -gal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). En algunas modalidades, un marcador de selección, tal como, por ejemplo, CD34 se expresa por una célula y el CD34 se puede usar para seleccionar, enriquecer o aislar (por ejemplo, mediante selección inmunomagnética) las células transducidas de interés para su uso en los métodos descritos en la presente descripción. Como se usa en la presente, un marcador de CD34 se distingue de un anticuerpo anti-CD34, o, por ejemplo, un scFv, TCR u otra porción de reconocimiento de antígeno que se une a CD34.

En algunas modalidades, un marcador de selección comprende un polipéptido RQR, un factor de crecimiento nervioso de baja afinidad truncado (tNGFR), un CD19 truncado (tCD19), un CD34 truncado (tCD34) o cualquier combinación de los mismos.

A modo de antecedentes, la inclusión de células T CD4⁺ en un producto de célula de inmunoterapia puede proporcionar secreción de IL-2 inducida por antígeno y aumentar la persistencia y la función de células T CD8⁺ citotóxicas transferidas (por ejemplo, Kennedy *et ál.* (2008) *Immunol. Rev.* 222:129 y Nakanishi *et ál.* *Nature* (2009) 52:510). En algunas modalidades, un TCR restringido a clase I en células T CD4⁺ puede requerir la transferencia de un correceptor CD8 para mejorar la sensibilidad del TCR a complejos de péptido HLA de clase I. Los correceptores de CD4 difieren en la estructura de CD8 y no pueden sustituir eficazmente a los correceptores de CD8 (por ejemplo, Stone & Kranz (2013) *Front. Immunol.* 4:244 y Cole *et ál.* (2012) *Immunology* 737:139). Por lo tanto, otra proteína accesorio para su uso en las composiciones y métodos abarcados por la presente invención comprende un correceptor CD8 o componente del mismo. Las células inmunitarias modificadas que comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica para una proteína de unión abarcada por la presente invención pueden, en algunas modalidades, comprender además un polinucleótido heterólogo que codifica para una proteína correceptora de CD8, o un componente de cadena beta o cadena alfa de la misma.

Una célula hospedadora se puede transducir eficientemente para contener, y puede expresar eficientemente, un polinucleótido individual que codifica para la proteína de unión, la proteína de cambio de seguridad, el marcador de selección y la proteína correceptora CD8.

En una modalidad, la célula hospedadora abarcada por la presente invención incluye además un ácido nucleico que codifica para una molécula coestimulante, de modo que la célula T modificado expresa la molécula coestimulante. En algunas modalidades, el dominio

coestimulante se selecciona de CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L.

En cualquiera de las modalidades anteriores, una célula hospedadora que expresa la proteína de unión descrita en la presente puede ser una célula inmunitaria universal. Una «célula

5 inmunitaria universal» comprende una célula inmunitaria que se ha modificado para reducir o eliminar la expresión de uno o más genes endógenos que codifican para un producto de polipéptido seleccionado de PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, una molécula de HLA, una molécula de TCR o cualquier combinación de los mismos. Sin desear limitarse por la teoría, ciertas proteínas de células inmunitarias expresadas endógenamente pueden disminuir de

10 forma regulada la actividad inmunitaria de las células inmunitarias modificadas (por ejemplo, PD-1, LAG-3, CTLA4, TIGIT), o pueden interferir con la actividad de unión de una proteína de unión expresada heterológamente abarcada por la presente invención (por ejemplo, un TCR endógeno que se une a un antígeno distinto de MAGEA1 e interfiere con la unión de la célula inmunitaria modificada a una célula diana que expresa un antígeno MAGEA1 tal como un

15 péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC. Además, las proteínas endógenas (por ejemplo, proteínas de células inmunitarias, tal como un alelo HLA) expresadas en una célula inmunitaria donante se pueden reconocer como extrañas por un hospedador alogénico, lo que puede dar como resultado la eliminación o supresión de la célula inmunitaria donante modificada por el hospedador alogénico.

20 Por consiguiente, disminuir o eliminar la expresión o actividad de estos genes o proteínas endógenos puede mejorar la actividad, tolerancia o persistencia de las células inmunitarias modificadas en un entorno de hospedador autólogo o alogénico, y permite la administración universal de las células (por ejemplo, a cualquier receptor independientemente del tipo de HLA). En algunas modalidades, las células de acuerdo con la presente invención son

25 singénicas, lo que significa que son genéticamente idénticas o suficientemente idénticas e inmunológicamente compatibles como para permitir el trasplante. En algunas modalidades, una célula inmunitaria universal es una célula donante (por ejemplo, alogénica) o una célula autóloga. En algunas modalidades, una célula inmunitaria modificada (por ejemplo, una célula inmunitaria universal) abarcada por la presente invención comprende una eliminación de

30 genes cromosómicos de uno o más de un gen que codifica para PD-1, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, un componente de HLA (por ejemplo, un gen que codifica una macroglobulina $\alpha 1$, una

macroglobulina $\alpha 2$, una macroglobulina $\alpha 3$, una microglobulina $\beta 1$ o una microglobulina $\beta 2$) o un componente de TCR (por ejemplo, un gen que codifica para una región variable de TCR o una región constante de TCR) (ver, por ejemplo, Torikai et ál. (2016) *Nature Sci. Rep.* 6:21757; Torikai et ál. (2012) *Blood* 179:5697; y Torikai et ál. (2013) *Blood* 722:1341, que también proporcionan técnicas de edición de genes representativas, de ejemplo, composiciones y terapias celulares adoptivas útiles de acuerdo con la presente invención).

Como se usa en la presente, el término «eliminación de genes cromosómicos» se refiere a una alteración genética o agente inhibidor introducido en una célula hospedadora que previene (por ejemplo, reduce, retrasa, suprime o anula) la producción, por la célula hospedadora, de un producto polipeptídico endógeno funcionalmente activo. Las alteraciones, que dan como resultado una eliminación de genes cromosómicos, pueden incluir, por ejemplo, mutaciones sin sentido introducidas (incluyendo la formación de codones de parada prematuros), mutaciones sin sentido, deleción de genes y roturas de hebra, así como la expresión heteróloga de moléculas de ácido nucleico inhibidoras que inhiben la expresión de genes endógenos en la célula hospedadora.

En algunas modalidades, una eliminación de genes cromosómicos o eliminación de genes se puede realizar mediante edición cromosómica de una célula hospedadora. La edición cromosómica se puede realizar usando, por ejemplo, endonucleasas. Como se usa en la presente «endonucleasa» se refiere a una enzima capaz de catalizar la escisión de una unión de fosfodiéster dentro de una cadena de polinucleótido. En algunas modalidades, una endonucleasa es capaz de escindir un gen diana inactivando o «eliminado» de este modo el gen diana. Una endonucleasa puede ser una endonucleasa de origen natural, recombinante, modificada genéticamente o de fusión. Las roturas de hebra de ácido nucleico provocadas por la endonucleasa se reparan comúnmente a través de los distintos mecanismos de recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ). Durante la recombinación homóloga, se puede usar una molécula de ácido nucleico donante para un gen donante «activación», para un gen diana «eliminación», y opcionalmente para inactivar un gen diana a través de un gen donante de activación o un evento de eliminación del gen diana. NHEJ es un proceso de reparación propenso a errores que a menudo da como resultado cambios en la secuencia de ADN en el sitio de la escisión, por ejemplo, una sustitución, deleción o adición de al menos un nucleótido. NHEJ se puede usar para «eliminar» un gen

diana. Ejemplos de endonucleasas incluyen nucleasas de dedos de zinc, nucleasas TALE, nucleasas CRISPR-Cas, meganucleasas y megaTAL.

Como se usa en la presente, una «nucleasa de dedos de zinc» (ZFN) se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN de dedos de zinc fusionado a un dominio de escisión de ADN no específico, tal como una endonucleasa FokI. Cada motivo de dedo de zinc de aproximadamente 30 aminoácidos se une a aproximadamente 3 pares de bases de ADN, y los aminoácidos en ciertos residuos se pueden cambiar para alterar la especificidad de secuencia de triplete (por ejemplo, Desjarlais et ál. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2256-2260 y Wolfe et ál. (1999) *J. Mol. Biol.* 255:1917-1934). Se pueden enlazar múltiples motivos de dedos de zinc en tándem para crear especificidad de unión a secuencias de ADN deseadas, tal como regiones que tienen una longitud que varía de aproximadamente 9 a aproximadamente 18 pares de bases. A modo de antecedente, las ZFN median en la edición del genoma catalizando la formación de una ruptura de doble hebra de ADN específica de sitio (DSB) en el genoma, y la integración dirigida de un transgén que comprende secuencias flanqueantes homólogas al genoma en el sitio de DSB se facilita mediante reparación dirigida por homología. Alternativamente, una DSB generada por una ZFN puede dar como resultado la eliminación del gen diana mediante reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es una vía de reparación celular propensa a errores que da como resultado la inserción o delección de nucleótidos en el sitio de escisión. En algunas modalidades, una eliminación de genes comprende una inserción, una delección, una mutación o una combinación de las mismas, realizada mediante el uso de una molécula de ZFN.

Como se usa en la presente, una «nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción» (TALEN) se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN TALE y un dominio de escisión de ADN, tal como una endonucleasa FokI. Un «dominio de unión al ADN de TALE» o «TALE» está compuesto por uno o más dominios/unidades de repetición de TALE, cada uno de los cuales en general tiene una secuencia de 33-35 aminoácidos altamente conservada con los aminoácidos 12 y 13 divergentes. Los dominios de repetición TALE están implicados en la unión del TALE a una secuencia de ADN diana. Los residuos de aminoácidos divergentes, referidos como diresiduo variable de repetición (RVD), se correlacionan con el reconocimiento de nucleótidos específicos. El código natural (canónico) para el reconocimiento de ADN de estos TALE se ha determinado de manera que una secuencia de HD (ácido histina-

aspártico) en las posiciones 12 y 13 del TALE conduce a la unión de TALE a citosina (C), NG (asparagina-glicina) se une a un nucleótido T, NI (asparagina-isoleucina) a A, NN (asparagina-asparagina) se une a un nucleótido G o A, y NG (asparagina-glicina) se une a un nucleótido T. Los RVD no canónicos (atípicos) también son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, publicación de patente estadounidense US2011/0301073, cuyos RVD atípicos se incorporan por referencia en la presente en su totalidad). Las TALEN se pueden usar para dirigir roturas de doble hebra específicas de sitio (DSB) en el genoma de células T. La unión de extremos no homólogos (NHEJ) liga el ADN de ambos lados de una ruptura de hebra doble en la que hay poco o ningún solapamiento de secuencia para la hibridación, introduciendo de este modo errores que eliminan la expresión de genes. Alternativamente, la reparación dirigida por homología puede introducir un transgén en el sitio de DSB siempre que las secuencias flanqueantes homólogas estén presentes en el transgén. En algunas modalidades, una eliminación de genes comprende una inserción, una delección, una mutación o una combinación de las mismas, y se realiza utilizando una molécula de TALEN.

Como se usa en la presente, un sistema de nucleasa de «repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interseparadas/Cas» (CRISPR/Cas) se refiere a un sistema que emplea una nucleasa Cas guiada por ARN CRISPR (ARNcr) para reconocer sitios diana dentro de un genoma (conocidos como protoseparadores) a través de complementariedad de emparejamiento de bases y luego escindir el ADN si un motivo asociado a protoseparador (PAM) corto y conservado sigue inmediatamente 3' de la secuencia diana complementaria. Los sistemas CRISPR/Cas se clasifican en tres tipos (es decir, tipo I, tipo II y tipo III) basándose en la secuencia y estructura de las nucleasas Cas. Los complejos de vigilancia guiados por ARNcr en los tipos I y III necesitan múltiples subunidades Cas. El sistema de tipo II, el más estudiado, comprende al menos tres componentes: una nucleasa Cas9 guiada por ARN, un ARNcr y un ARNcr que actúa en trans (ARNtracr). El ARNtracr comprende una región formadora de dúplex. Un ARNcr y un ARNtracr forman un dúplex que es capaz de interactuar con una nucleasa Cas9 y guiar el complejo Cas9/ARNcr:ARNtracr a un sitio específico en el ADN diana a través del emparejamiento de bases de Watson-Crick entre el separador en el ARNcr y el protoseparador en el ADN diana corriente arriba de un PAM. La nucleasa Cas9 escinde una ruptura de hebra doble dentro de una región definida por el separador de ARNcr. La reparación por NHEJ da como resultado inserciones y/o delecciones que interrumpen la

expresión del locus diana. Como alternativa, se puede introducir un transgén con secuencias flanqueantes homólogas en el sitio de DSB mediante reparación dirigida por homología. El ARNcr y ARNtracr se pueden modificar en un solo ARN guía (ARNsg o ARNg) (por ejemplo, Jinek et ál. (2012) *Science* 337:816-821). Además, la región del ARN guía complementaria al sitio diana se puede alterar o programar para dirigirse a una secuencia deseada (Xie et ál. (2014) *PLOS One* 9:e100448, *publicación de patente* estadounidense n.º US 2014/0068797, *publicación de patente* estadounidense n.º US 2014/0186843, *patente estadounidense* n.º 8,697,359, y Publ. PCT n.º WO 2015/071474). En algunas modalidades, una eliminación de genes comprende una inserción, una delección, una mutación o una combinación de las mismas, y se realiza utilizando un sistema de nucleasa CRISPR/Cas.

Las secuencias de ARNg de ejemplo y los métodos de uso de las mismas para eliminar genes endógenos que codifican para proteínas de células inmunitarias incluyen aquellos descritos en Ren et ál. (2017) *Clin. Cancer Res.* 23:2255-2266, que proporciona ARNg representativos a modo de ejemplo, ADN de CAS9, vectores y técnicas de inactivación génica.

Como se usa en la presente, una «meganucleasa», también denominada «endonucleasa de asentamiento», se refiere a una endodesoxirribonucleasa caracterizada por un sitio de reconocimiento grande (secuencias de ADN de hebra doble de aproximadamente 12 a aproximadamente 40 pares de bases). Las meganucleasas se pueden dividir en cinco familias basadas en motivos de secuencia y estructura: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, caja His-Cys y PD-(D/E)XK. Meganucleasas de ejemplo incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, RI-Sce, I-SceIV, I-Csml, I-PanI, I-Scell, I-Ppol, I-ScellI, I-Crel, I-TevI, I-TevII e I-TevIII, cuyas secuencias de reconocimiento son bien conocidas (por ejemplo, patentes estadounidenses n.º 5,420,032 y 6,833,252, Belfort et ál. (1997) *Nucl. Acids Res.* 25:3379-3388, Dujon et ál. (1989) *Gene* 52:115-118, Perler et ál. (1994) *Nucl. Acids Res.* 22:1125-1127, Jasin (1996) *Trends Genet.* 72:224-228, Gimble et ál. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180, y Argast et ál. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353).

En algunas modalidades, las meganucleasas de origen natural se pueden utilizar para promover la modificación genómica específica del sitio de una diana de interés, tal como un punto de control inmunitario, un gen que codifica para HLA o un gen que codifica para un componente de TCR.

En otras modalidades, se usa una meganucleasa modificada que tiene una nueva

especificidad de unión para un gen diana para la modificación genómica específica del sitio (ver, por ejemplo, Porteus et ál. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:967-73, Sussman et ál. (2004) *J. Mol. Biol.* 342:31-41, Epinat et ál. (2003) *Nucl. Acids Res.* 37:2952-2962, Chevalier et ál. (2002) *Mol. Cell* 70:895-905, Ashworth et ál. (2006) *Nature* 441:656-659, Paques et ál. (2007) *Curr. Gene Ther.* 7:49-66, y las publicaciones de patente estadounidense n.º US 2007/0117128, US 2006/0206949, US 2006/0153826, US 2006/0078552 y US 2004/0002092). En modalidades adicionales, se genera una eliminación de genes cromosómicos usando una endonucleasa de asentamiento que se ha modificado con dominios de unión a ADN modulares de TALEN para producir una proteína de fusión conocida como megaTAL. Los MegaTAL se pueden utilizar no solo para inactivar uno o más genes diana, sino también para introducir (inactivar) polinucleótidos heterólogos o exógenos cuando se usan en combinación con un molde donante exógeno que codifica para un polipéptido de interés.

En algunas modalidades, una eliminación de genes cromosómicos comprende una molécula de ácido nucleico inhibidora que se introduce en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula inmunitaria) que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica para un receptor específico de antígeno que se une (por ejemplo, específica y/o selectivamente) a un antígeno MAGEA1, en donde la molécula de ácido nucleico inhibidora codifica para un inhibidor específico de diana y en donde el inhibidor específico de diana codificado inhibe la expresión de genes endógenos (es decir, de PD-1, TIM3, LAG3, CTLA4, TIGIT, un componente HLA, o un componente TCR, o cualquier combinación de los mismos) en la célula inmunitaria hospedadora.

Una eliminación de genes cromosómicos se puede confirmar directamente por secuenciación de ADN de la célula inmunitaria hospedadora después del uso del procedimiento o agente de eliminación.

Las eliminaciones de genes cromosómicos también se pueden inferir de la ausencia de expresión de genes (por ejemplo, la ausencia de un ARNm o producto de polipéptido codificado por el gen) después de la eliminación.

En algunas modalidades, una célula hospedadora abarcada por la presente invención es capaz de eliminar específica y/o selectivamente 50% o más de células diana que comprenden un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC.

En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es capaz de producir una citocina cuando se pone en contacto con células diana que comprenden un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC.

- 5 En algunas modalidades, la citocina comprende IFN- γ o IL2. En algunas modalidades, la citocina comprende TNF- α .

En algunas modalidades, la célula hospedadora es capaz de producir un nivel más alto de citoquina o una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana con expresión de MAGEA1 a un nivel de menos de o igual a aproximadamente 1000 transcritos por millón de transcritos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM y 1 TPM, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, tal como menor que o igual a aproximadamente 1000 TPM a menor que o igual a aproximadamente 35 TPM). En algunas modalidades, el nivel de expresión de MAGEA1 bajo se denomina «expresión heterocigota» que significa entre aproximadamente 1 TPM y aproximadamente 35 TPM, o cualquier intervalo entre los mismos, inclusive, tal como 1-32 TPM. Por ejemplo, la célula hospedadora es capaz de producir al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces, o más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, por ejemplo, de 1,2 veces a 2 veces, un mayor nivel de citocina o una molécula citotóxica.

En algunas modalidades, la célula hospedadora es capaz de aniquilar específica y/o selectivamente una célula diana que expresa MAGEA1 (por ejemplo, una célula hiperproliferativa que expresa MAGEA1). En determinadas modalidades, la célula diana

expresa un péptido inmunogénico de MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula de MHC coincidente).

En algunas modalidades, las células hospedadoras no expresan el antígeno MAGEA1, no son reconocidas por una proteína de unión descrita en la presente, no son de serotipo HLA-C*07 y/o no expresan un alelo HLA-C*07, tal como HLA-C*0702, HLA-C*0701 y/o alelos HLA-C*0704. Por ejemplo, un paciente puede recibir células hospedadoras de un donante sano que es negativo para MAGEA1 o negativo para HLA-C*07:02, o incluso células autólogas que fueron seleccionadas y/o modificadas. Se pueden usar células aisladas de ese donante como fuente de material de trasplante. En paralelo, las células T aisladas del mismo donante se pueden modificar genéticamente para reconocer MAGEA1, tal como expresando una proteína de unión a MAGEA1 descrita en la presente. Se pueden usar células donantes para injertar poblaciones de células en el paciente (por ejemplo, células madre hematopoyéticas usadas para reconstituir un sistema inmunitario) y se pueden infundir células hospedadoras en el paciente con el objetivo de provocar un efecto antitumoral altamente específico. Las células T de donante modificadas se pueden diseñar para reconocer y eliminar células positivas para MAGEA1 del paciente, evitando de este modo la recaída y promoviendo curas completas de trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1. Dado que las células transplantadas se obtienen del donante y, por lo tanto, son negativas para MAGEA1, negativas para serotipo HLA-C*07 y/o negativas para alelo HLA-C*07 (por ejemplo, negativas para los alelos HLA-C*0702, HLA-C*0701 y/o HLA-C*0704), las células modificadas descritas en la presente pueden tener efectos secundarios tóxicos mínimos. Estas células hospedadoras coincidentes con el paciente y métodos de tratamiento se pueden usar de acuerdo con métodos terapéuticos descritos adicionalmente a continuación.

En algunas modalidades, la aniquilación se determina por un ensayo de aniquilación. En alguna modalidad, el ensayo de aniquilación se lleva a cabo cocultivando la célula hospedadora y la célula diana en una relación de 20:1 a 0,625:1, por ejemplo, de 15:1 a 1,25:1, de 10:1 a 1,5:1, de 8:1 a 3:1, de 6:1 a 5:1, de 20:1 a 5:1, de 10:1 a 2,5:1, etc. En algunas modalidades, la célula diana se pulsa con 1 µg/ml a 50 pg/ml de péptido MAGEA1, por ejemplo, de 1 ug/ml a 10 ng/ml, 500 ng/ml a 0,5 ng/ml, de 10 ng/ml a 10 pg/ml de 250 ng/ml a 1 ng/ml, de 50 ng/ml a 5 ng/ml, de 20 ng/ml a 10 ng/ml, etc.

En algunas modalidades, la célula hospedadora es capaz de aniquilar un mayor número de

células diana cuando se pone en contacto con células diana con un nivel de MAGEA1 menor o igual a aproximadamente 1000 transcritos por millón de transcritos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM y 1 TPM, o cualquier intervalo entre, inclusive, tal como menor que o igual a aproximadamente 1000 TPM a menor que o igual a aproximadamente 73 TPM). Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser capaz de aniquilar al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces, o más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive, por ejemplo, de 1,2 a 2 veces, mayor número de células diana.

La presente invención proporciona además una población de células que comprende al menos una célula hospedadora descrita en la presente. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula hospedadora (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinante, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células hospedadoras (por ejemplo, que consta esencialmente de) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una célula hospedadora individual que comprende un vector de expresión recombinante, tal que todas las células de la población comprendan el vector de expresión recombinante. En una

modalidad abarcada por la presente invención, la población de células es una población clonal que comprende células hospedadoras que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en la presente.

5 En una modalidad abarcada por la presente invención, los números de células en la población se pueden expandir rápidamente. La expansión de los números de células T se puede lograr por cualquiera de un número de métodos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, patentes estadounidenses n.º 8,034,334 y 8,383,099, publicación de patente estadounidense n.º 2012/0244133, Dudley *et ál.* (2003) *J. Immunother.* 26:332-242, y Riddell *et ál.* (1990) *J. Immunol. Methods* 128:189-201). Por ejemplo, la expansión de los números de células T se
10 puede llevar a cabo al cultivar las células T con anticuerpo de OKT3, IL-2, y PBMC alimentador (por ejemplo, PBMC alogénico irradiado).

VIII. Composiciones farmacéuticas

15 En otro aspecto abarcado por la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas en la presente que comprenden composiciones descritas en la presente (por ejemplo, proteínas de unión, ácidos nucleicos, células y similares) y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La expresión «farmacéuticamente aceptable» se refiere a aquellos agentes, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico,
20 adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Los agentes y otras composiciones abarcadas por la presente invención se pueden formular especialmente para administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas
25 para diversas vías de administración, tal como (1) administración oral, por ejemplo, empapamientos (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, bolos, polvos, gránulos, pastas; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, pomada o pulverización aplicada a la piel; (4)
30 intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; o (5) aerosol, por ejemplo, como un aerosol acuoso, preparación liposomal o partículas sólidas que contienen el

compuesto. Se contempla cualquier factor de forma apropiado para un agente o composición descrito en la presente, tal como, pero no limitado a, tabletas, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas.

Las composiciones farmacéuticas abarcadas por la presente invención se pueden presentar como formas de dosificación discretas, tal como cápsulas, bolsitas o tabletas, o líquidos o aerosoles que contienen cada uno una cantidad predeterminada de un ingrediente activo como un polvo o en gránulos, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión de aceite en agua, una emulsión líquida de agua en aceite, polvos para reconstitución, polvos para consumos orales, botellas (incluyendo polvos o líquidos en una botella), películas, pastillas, pastas, tubos, gomas y envases que se disuelven por vía oral. Estas formas de dosificación se pueden preparar por cualquiera de los métodos de la farmacia. Los excipientes adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares y combinaciones de los mismos. En algunas modalidades, las composiciones que comprenden células hospedadoras, proteínas de unión o proteínas de fusión como se describen en la presente comprenden además un medio de infusión adecuado. Los medios de infusión adecuados pueden ser cualquier formulación de medio isotónico, habitualmente solución salina normal, Normosol™-R (Abbott) o Plasma-Lyte™ A (Baxter), dextrosa al 5% en agua, se puede utilizar lactato de Ringer. Un medio de infusión se puede complementar con albúmina de suero humano u otros componentes de suero humano. También se contemplan dosis unitarias que comprenden una cantidad eficaz de una célula hospedadora, o composición. En la presente también se proporcionan dosis unitarias que comprenden una cantidad eficaz de una célula hospedadora o de una composición que comprende la célula hospedadora. Como se describe en la presente, las células hospedadoras incluyen células inmunes, células T (células T CD4⁺ y/o células T CD8⁺), linfocitos citotóxicos (por ejemplo, células T citotóxicas y/o células aniquiladoras naturales (NK)), y similares. Por ejemplo, en algunas modalidades, una dosis unitaria comprende una composición que comprende al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%), al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de células modificadas, ya sea solo o en combinación con otras células, tal como que comprende al menos aproximadamente 30%, al menos

- aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%), al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% de otras células. En algunas modalidades, las células no deseadas están presentes en una
- 5 cantidad reducida o sustancialmente no están presentes, tal como menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 40%, menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente 1% de la población de células en la composición.
- 10 La cantidad de células en una composición o dosis unitaria es al menos una célula (por ejemplo, al menos una célula T CD8⁺ modificada, una célula T CD4⁺ modificada y/o una célula NK) o es más habitualmente más de 10² células, por ejemplo, hasta 10⁶, hasta 10⁷, hasta 10⁸ células, hasta 10⁹ células o más de 10¹⁰ células. En algunas modalidades, las células se administran en un intervalo de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10¹⁰ células/m², tal
- 15 como en un intervalo de aproximadamente 10⁵ a aproximadamente 10⁹ células/m². El número de células dependerá del uso final para el que se pretenda la composición, así como del tipo de células incluidas en la misma. Por ejemplo, las células modificadas para contener una proteína de unión específica para un antígeno particular comprenderán una población celular que contiene al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,
- 20 90%, 95% o más de estas células. Para los usos proporcionados en la presente, las células se encuentran en general en un volumen de un litro o menos, 500 ml o menos, 250 ml o menos o 100 ml o menos. En modalidades, la densidad de las células deseadas es habitualmente mayor que 10⁴ células/ml y en general es mayor que 10⁷ células/ml, en general 10⁸ células/ml o mayor. Las células se pueden administrar como una infusión individual o en infusiones múltiples
- 25 durante un intervalo de tiempo. Un número clínicamente relevante de células inmunitarias se puede repartir en múltiples infusiones que acumulativamente son iguales o superiores a 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ o 10¹¹ células. En algunas modalidades, una dosis unitaria de las células inmunitarias modificadas se puede coadministrar con (por ejemplo, simultánea o contemporáneamente) células madre hematopoyéticas de un donante alogénico.
- 30 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad o condición que se va a tratar (o prevenir) según lo determinado por los expertos

en la técnica médica. Se determinará una dosis adecuada y una duración y frecuencia de administración adecuadas de las composiciones por factores tal como la condición de salud del paciente, el tamaño del paciente (es decir, peso, masa o área corporal), el tipo y gravedad de la condición del paciente, la forma particular del ingrediente activo y el método de administración. En general, una dosis y un régimen de tratamiento adecuados proporcionan la una o más composiciones en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico (tal como se describe en la presente, que incluye un resultado clínico mejorado, tal como remisiones completas o parciales más frecuentes, o supervivencia general y/o libre de enfermedad más prolongada, o una disminución de la gravedad de los síntomas).

Una cantidad efectiva de una composición farmacéutica se refiere a una cantidad suficiente, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr los resultados clínicos deseados o el tratamiento beneficioso, como se describe en la presente. Se puede distribuir una cantidad eficaz en una o más administraciones. Si la administración es a un sujeto ya conocido o confirmado que tiene una enfermedad o estado de enfermedad, el término «cantidad terapéuticamente eficaz» se puede usar en referencia al tratamiento, mientras que «cantidad profilácticamente eficaz» se puede usar para describir la administración de una cantidad eficaz a un sujeto que es susceptible o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o estado de enfermedad (por ejemplo, recurrencia) como un curso preventivo.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden presentar en contenedores de dosis unitaria o multidosis, tal como ampollas o viales sellados. Estos contenedores se pueden congelar para preservar la estabilidad de la formulación hasta la infusión en el paciente. En algunas modalidades, una dosis unitaria comprende una célula hospedera como se describe en la presente en una dosis de aproximadamente 10^7 células/m² a aproximadamente 10^{11} células/m². El desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en la presente en una variedad de regímenes de tratamiento, que incluyen, por ejemplo, administración o formulación parenteral o intravenosa.

Si la presente composición se administra por vía parenteral, la composición también puede incluir una solución o suspensión acuosa u oleaginosa estéril. Los diluyentes o solventes parenteralmente aceptables no tóxicos adecuados incluyen agua, solución de Ringer, solución

de sal isotónica, 1,3-butanodiol, etanol, propilenglicol o polietilenglicoles en mezclas con agua. Las soluciones o suspensiones acuosas pueden comprender además uno o más agentes amortiguadores, tal como acetato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio o tartrato de sodio. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier formulación de unidad

5 de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida. La forma de unidad de dosificación, como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad puede contener una cantidad
10 predeterminada de células inmunitarias modificadas o compuesto activo calculado para producir el efecto deseado en asociación con un portador farmacéutico apropiado.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica descrita en la presente y como se describió anteriormente para composiciones inmunogénicas ejemplificadas representativamente para péptidos, cuando se administra a un sujeto, puede provocar una
15 respuesta inmunitaria contra una célula de interés que expresa MAGEA1. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser útiles como vacunas para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

IX. Usos y métodos

20 Las composiciones descritas en la presente se pueden usar en una variedad de aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas. En cualquier método descrito en la presente, tal como un método de diagnóstico, método de pronóstico, método terapéutico o combinación de los mismos, todos los pasos del método pueden ser realizados por un solo actor o, alternativamente, por más de un actor. Por ejemplo, el diagnóstico se puede realizar
25 directamente por el actor que proporciona el tratamiento terapéutico. Alternativamente, una persona que proporciona un agente terapéutico puede solicitar que se realice un ensayo de diagnóstico. El especialista en diagnóstico y/o el intervencionista terapéutico pueden interpretar los resultados del ensayo de diagnóstico para determinar una estrategia terapéutica. De manera similar, estos procesos alternativos se pueden aplicar a otros ensayos,
30 tal como ensayos de pronóstico.

En algunos usos y métodos abarcados por la presente invención, se utilizan sujetos o muestras

de sujetos. En algunas modalidades, el sujeto es un animal. El animal puede ser de cualquier sexo y puede estar en cualquier etapa de desarrollo. En algunas modalidades, los animales son un vertebrado, tal como un mamífero. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas modalidades, el sujeto es un animal domesticado, tal como un perro, gato, vaca, cerdo, caballo, oveja o cabra. En algunas modalidades, el sujeto es un animal de compañía, tal como un perro o gato. En algunas modalidades, el sujeto es un animal de ganado, tal como una vaca, cerdo, caballo, oveja o cabra. En algunas modalidades, el sujeto es un animal de zoológico. En algunas modalidades, el sujeto es un animal de investigación, tal como un roedor (por ejemplo, ratón o rata), perro, cerdo o primate no humano. En algunas modalidades, el animal es un animal modificado genéticamente. En algunas modalidades, el animal es un animal transgénico (por ejemplo, ratones transgénicos y cerdos transgénicos). En algunas modalidades, el sujeto es un pez o reptil.

En algunas modalidades, el sujeto es un roedor, tal como un ratón. En algunas de estas modalidades, el ratón es un ratón transgénico, tal como un ratón que expresa moléculas de MHC humano (es decir, HLA), tal como HLA-B72 (por ejemplo, Nicholson et ál. (2012) *Adv. Hematol.* 2012:404081). En algunas modalidades, el sujeto es un ratón transgénico que expresa TCR humanos o es un ratón negativo al antígeno (por ejemplo, Li et ál. (2010) *Nat. Med.* 16:1029-1034 y Obenaus et ál. (2015) *Nat. Biotechnol.* 33:402-407). En algunas modalidades, el sujeto es un ratón transgénico que expresa moléculas de HLA humano y TCR humanos. En algunas modalidades, tal como donde el sujeto es un ratón HLA transgénico, los TCR identificados se modifican, por ejemplo, para ser quiméricos o humanizados. En algunas modalidades, el andamiaje de TCR se modifica, tal como análogo a métodos de humanización de proteínas de unión conocidos.

En algunas modalidades, el sujeto es un humano. En algunas modalidades, el sujeto es un modelo animal de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, tal como un cáncer. Por ejemplo, el modelo animal puede ser un modelo animal de xenoinjerto ortotópico de un cáncer derivado de humano.

En algunas modalidades, el sujeto es un humano, tal como un humano con un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

Los métodos descritos en la presente se pueden usar para tratar a un sujeto en necesidad del mismo. Como se usa en la presente, un «sujeto que lo necesita» incluye cualquier sujeto que

tenga un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, una recaída de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1y/o que esté predispuesto a un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

- En algunas modalidades de los métodos comprendidos por la presente invención, el sujeto no se ha sometido a tratamiento para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, tal como quimioterapia, terapia con radiación, terapia dirigida y/o inmunoterapia. En algunas modalidades, el sujeto se ha sometido a tratamiento para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, tal como quimioterapia, terapia con radiación, terapia dirigida y/o inmunoterapia.
- En algunas modalidades, el sujeto se ha sometido a una cirugía para remover el tejido canceroso o precanceroso. En algunas modalidades, el tejido canceroso no se ha removido, por ejemplo, el tejido canceroso se puede ubicar en una región inoperable del cuerpo, tal como en un tejido que es esencial para la vida, o en una región donde un procedimiento quirúrgico causaría un riesgo considerable de daño al paciente.
- En algunas modalidades, el sujeto o las células del mismo son resistentes a una terapia de relevancia, tal como resistente a la terapia estándar de atención, terapia de inhibidor de puntos de control inmunitario y similares. Por ejemplo, la modulación de uno o más biomarcadores abarcados por la presente invención puede superar la resistencia a la terapia con inhibidor del punto de control inmunitario.
- En algunas modalidades, los sujetos necesitan modulación de acuerdo con las composiciones y métodos descritos en la presente, tal como que se han identificado como que tienen una ausencia, presencia o expresión de MAGEA1 aberrante no deseada.
- a. Métodos de diagnóstico
- En un aspecto abarcado por la presente invención, se proporcionan en la presente métodos de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un antígeno MAGEA1, un complejo de antígeno de MAGEA1-MHC, una célula de interés que expresa MAGEA1 y/o una célula que ha estado expuesta a MAGEA1, que comprenden detectar la presencia o ausencia de este antígeno MAGEA1 en una muestra mediante el uso de al menos una proteína de unión, o al menos una célula hospedadora descrita en la presente. En algunas modalidades, el método comprende además obtener la muestra (por ejemplo, de un sujeto). En algunas modalidades, al menos una proteína de unión o al menos una célula hospedadora, forma un complejo con

un epítipo peptídico de MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC, y el complejo se detecta en forma de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), ensayo de radioinmunidad (RIA), inmunoquímicamente, transferencia Western o ensayo de flujo intracelular.

- 5 En un aspecto abarcado por la presente invención, se proporcionan en la presente métodos de diagnóstico para detectar el nivel de MAGEA1 o un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto, que comprenden: a) poner en contacto una muestra obtenida del sujeto con al menos un agente (por ejemplo, un péptido inmunogénico de MAGEA1, complejo de péptido inmunogénico de MAGEA1-MHC (pMHC), proteína de unión, célula hospedadora
10 o una población de células hospedadoras descritas en la presente); y b) detectar el nivel de reactividad, donde un nivel de reactividad más alto en comparación con un nivel de control indica el nivel de un caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

En algunas modalidades, el nivel de reactividad se indica por activación de células T o función efectora, tal como, de modo no taxativo, proliferación de células T, aniquilación o liberación de
15 citocinas. El nivel de control puede ser un número de referencia o un nivel de un sujeto sano que no tiene exposición a un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

Se puede obtener una muestra biológica de un sujeto para determinar la presencia y el nivel de una respuesta inmunitaria al agente como se describe en la presente. Una «muestra biológica» como se usa en la presente puede ser una muestra de sangre (a partir de la cual se
20 puede preparar suero o plasma), muestra de biopsia, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, PBMC aisladas, células T aisladas, lavado de pulmón, ascitis, lavados de la mucosa, fluido sinovial, etc.), médula ósea, ganglios linfáticos, explante de tejido, cultivo de órganos, o cualquier otra preparación de tejido o célula del sujeto o una fuente biológica. Las muestras biológicas también se pueden obtener del sujeto antes de recibir cualquier composición
25 farmacéutica, muestra biológica que es útil como control para establecer los datos de referencia.

Las respuestas de células T específicas de antígeno se determinan habitualmente por comparaciones de respuestas de células T observadas de acuerdo con cualquiera de los parámetros funcionales de células T descritos en la presente (por ejemplo, proliferación,
30 liberación de citocinas, actividad de CTL, fenotipo de marcador de superficie celular alterado, etc.) que se pueden hacer entre células T que se exponen a un antígeno afín en un contexto

apropiado (por ejemplo, el antígeno usado para cebar o activar las células T, cuando se presentan por células presentadoras de antígeno inmunocompatibles) y células T de la misma población fuente que se exponen en cambio a un antígeno de control estructuralmente distinto o irrelevante. Una respuesta al antígeno afín que es mayor, con significación estadística, que la respuesta al antígeno de control significa especificidad de antígeno.

El nivel de una respuesta inmunitaria, tal como un linfocito T citotóxico (CTL) se puede determinar por cualquiera de numerosos métodos inmunológicos descritos en la presente y practicados rutinariamente en la técnica. Por ejemplo, el nivel de una respuesta inmunitaria de CTL se puede determinar antes y después de la administración de cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente expresadas por, por ejemplo, una célula T. Los ensayos de citotoxicidad para determinar la actividad de CTL se pueden realizar usando una cualquiera de varias técnicas y métodos rutinariamente practicados en la técnica (por ejemplo, Henkart et ál., "Cytotoxic T-Lymphocytes" en Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), páginas 1127-50, y las referencias citadas en el mismo).

La presente invención proporciona, en parte, métodos, sistemas y código para clasificar con precisión si una muestra biológica está asociada con una salida de interés, tal como la expresión de una diana de interés, tal como MAGEA1. En algunas modalidades, la presente invención es útil para clasificar una muestra (por ejemplo, de un sujeto) como asociada con o en riesgo de responder o no responder a terapia para un trastorno caracterizado por expresión de MAGEA1 usando un algoritmo estadístico y/o datos empíricos.

Un método de ejemplo para detectar la cantidad o actividad de MAGEA1, y por lo tanto útil para clasificar si es probable o improbable que una muestra responda a una terapia para un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1 implica poner en contacto una muestra biológica con un agente, tal como un péptido inmunogénico de MAGEA1 o agente de unión descrito en la presente, capaz de detectar la cantidad o actividad de MAGEA1 en la muestra biológica. En algunas modalidades, el método comprende además obtener una muestra biológica, tal como de un sujeto de prueba. En algunas modalidades, se usa al menos un agente, donde dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de estos agentes se pueden usar en combinación (por ejemplo, en ELISA de sándwich) o en serie. En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema clasificador estadístico de aprendizaje individual. Por ejemplo, se puede usar un sistema clasificador estadístico de aprendizaje individual para

clasificar una muestra con base en una predicción o valor de probabilidad y la presencia o nivel del biomarcador. El uso de un sistema clasificador estadístico de aprendizaje individual clasifica habitualmente la muestra con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o precisión general de al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

Otros algoritmos estadísticos adecuados se conocen por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen una técnica algorítmica de aprendizaje automático capaz de adaptarse a conjuntos de datos complejos (por ejemplo, panel de marcadores de interés) y tomar decisiones basadas en estos conjuntos de datos. En algunas modalidades, se usa un sistema clasificador estadístico de aprendizaje individual tal como un árbol de clasificación (por ejemplo, bosque aleatorio). En otras modalidades, se usa una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, preferentemente en tándem. Los ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen, pero no se limitan a, aquellos que usan aprendizaje inductivo (por ejemplo, árboles de decisión/clasificación tal como bosques aleatorios, árboles de clasificación y regresión (C&RT), árboles reforzados, etc.), aprendizaje probablemente aproximadamente correcto (PAC), aprendizaje conexionista (por ejemplo, redes neuronales (NN), redes neuronales artificiales (ANN), redes neuro difusas (NFN), estructuras de red, perceptrones como perceptrones multicapa, redes de alimentación directa multicapa, aplicaciones de redes neuronales, aprendizaje bayesiano en redes de creencias, etc.), aprendizaje de refuerzo (por ejemplo, aprendizaje pasivo en un entorno conocido como aprendizaje ingenuo, aprendizaje dinámico adaptativo y aprendizaje de diferencia temporal, aprendizaje pasivo en un entorno desconocido, aprendizaje activo en un entorno desconocido, funciones de valor de acción de aprendizaje, aplicaciones de aprendizaje de refuerzo, etc.) y algoritmos genéticos y programación evolutiva. Otros sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen máquinas de vectores de soporte (por ejemplo, métodos de Kernel), splines de regresión adaptativa multivariante (MARS), algoritmos de Levenberg-Marquardt, algoritmos de Gauss-Newton, mezclas de gaussianos, algoritmos de descenso de gradiente y cuantificación de vectores de aprendizaje (LVQ). En ciertas modalidades, el método abarcado por la presente invención comprende además enviar los resultados de clasificación de

muestras a un médico, por ejemplo, un oncólogo.

En algunas modalidades, el diagnóstico de un sujeto (por ejemplo, que incluye tipificación de HLA y/o pérdida de heterocigosidad (LOH) para determinar la compatibilidad con el complejo TCR-HLA que se une a los TCR de interés) es seguido por la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento definido en base al diagnóstico.

En algunas modalidades, los métodos implican además obtener una muestra biológica de control (por ejemplo, muestra biológica de un sujeto que no tiene un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1, un sujeto que está en remisión, un sujeto cuyo trastorno es susceptible a terapia, un sujeto cuyo trastorno está progresando u otros sujetos de interés).

- 10 En algunas modalidades de los métodos analíticos descritos en la presente, la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, en una muestra de un sujeto) se compara con una muestra de control (estándar) predeterminada. La muestra del sujeto es típicamente de un tejido enfermo, tal como células o tejidos cancerosos. La muestra testigo puede ser del mismo sujeto o de un sujeto diferente. La muestra testigo es típicamente una muestra normal, no enferma. Sin embargo, en algunas modalidades, tal como para estadificar la enfermedad o para evaluar la eficacia del tratamiento, la muestra de control puede ser de un tejido enfermo. La muestra de control puede ser una combinación de muestras de varios sujetos diferentes. En algunas modalidades, la medición de la expresión de MAGEA1 de un sujeto se compara con un nivel predeterminado. Este nivel predeterminado se obtiene típicamente de muestras normales.
- 20 Como se describe en la presente, una expresión «predeterminada» se puede usar para, a modo de ejemplo solamente, evaluar un sujeto que se puede seleccionar para tratamiento, evaluar una respuesta al cáncer y/o evaluar una respuesta a una terapia de combinación contra el cáncer. Una cantidad de biomarcador predeterminada y/o mediciones de actividad se pueden determinar en poblaciones de pacientes con o sin un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. La cantidad de biomarcadores predeterminados y/o mediciones de actividad pueden ser un número individual, igualmente aplicable a cada paciente, o la cantidad de biomarcadores predeterminados y/o mediciones de actividad pueden variar de acuerdo con subpoblaciones específicas de pacientes. La edad, peso, altura y otros factores de un sujeto pueden afectar la cantidad de biomarcador y/o las mediciones de actividad predeterminadas del individuo. Además, la cantidad y/o actividad de biomarcador predeterminada se puede determinar para cada sujeto individualmente. En una modalidad, las cantidades determinadas
- 25
- 30

y/o comparadas en un método descrito en la presente se basan en mediciones absolutas.

En otra modalidad, las cantidades determinadas y/o comparadas en un método descrito en la presente se basan en mediciones relativas, tal como relaciones (por ejemplo, números de copias de biomarcadores, nivel y/o actividad antes de un tratamiento versus después de un tratamiento, estas mediciones de biomarcadores con respecto a un control enriquecido o artificial, estas mediciones de biomarcadores con respecto a la expresión de un gen de mantenimiento y similares). Por ejemplo, el análisis relativo se puede basar en la relación de medición de biomarcadores antes del tratamiento en comparación con la medición de biomarcadores después del tratamiento. La medición del biomarcador antes del tratamiento se puede realizar en cualquier momento antes del inicio de una terapia. La medición de biomarcadores después del tratamiento se puede realizar en cualquier momento después del inicio de la terapia. En algunas modalidades, las mediciones de biomarcadores posteriores al tratamiento se realizan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 semanas o más después del inicio de la terapia, e incluso más tiempo hacia indefinidamente para el monitoreo continuo. El tratamiento puede comprender terapia para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, ya sea solo o en combinación con otros agentes, tal como agentes anticancerosos como quimioterapia o inhibidores del punto de control inmunitario.

La expresión de MAGEA1 predeterminada puede ser cualquier patrón adecuado. Por ejemplo, la expresión de MAGEA1 predeterminada se puede obtener del mismo sujeto o de un sujeto diferente para el que se está evaluando una selección de sujeto. En una modalidad, la cantidad de biomarcador y/o mediciones de actividad predeterminadas se pueden obtener de una evaluación previa del mismo paciente. De tal manera, el progreso de la selección del paciente se puede monitorizar a lo largo del tiempo. Además, el control se puede obtener a partir de una evaluación de otro humano o múltiples humanos, por ejemplo, grupos seleccionados de humanos, si el sujeto es un humano. De tal manera, el grado de la selección del humano para el que se está evaluando la selección se puede comparar con otros humanos adecuados, por ejemplo, otros humanos que están en una situación similar al humano de interés, tal como aquellos que padecen condiciones similares o iguales y/o del mismo grupo étnico.

En algunas modalidades, el cambio de la expresión de MAGEA1 desde el nivel predeterminado es aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0,

4,5 o 5,0 veces o más, o cualquier intervalo intermedio, inclusive. Estos valores de corte se aplican igualmente cuando la medición se basa en cambios relativos, tal como se basa en la relación de la medición de biomarcadores antes del tratamiento en comparación con la medición de biomarcadores después del tratamiento.

- 5 En algunas modalidades, la expresión de MAGEA1 se puede detectar y/o cuantificar mediante la detección o cuantificación del polipéptido de MAGEA1 o antígeno del mismo, tal como mediante el uso de una composición descrita en la presente. El polipéptido se puede detectar y cuantificar por cualquiera de una serie de medios bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como por inmunodifusión, inmunolectroforesis, radioinmunoensayo (RIA),
10 ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, transferencia Western, ensayos de ligante-ligando, técnicas inmunohistoquímicas, aglutinación, ensayos de complemento, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de capa delgada (TLC), cromatografía de hiperdifusión y similares (por ejemplo, Inmunología Básica y Clínica, Sites and Terr, eds., Appleton y Lange, Norwalk, Conn. pp 217-
15 262, 1991).

b.Métodos terapéuticos

- En un aspecto abarcado por la presente invención, en la presente se proporcionan métodos para prevenir y/o tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, y/o para
20 inducir una respuesta inmunitaria contra una célula de interés, tal como una célula hiperproliferativa, que expresa MAGEA1. En algunas modalidades, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en la presente, tal como una composición inmunogénica, células que expresan al menos una proteína de unión, y similares. Los métodos abarcados por la presente invención también se
25 pueden usar para determinar la capacidad de respuesta a la terapia contra el cáncer de muchos cánceres diferentes en sujetos, tal como aquellos descritos en la presente.

- En algunas modalidades, el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es un cáncer. Los términos «cáncer» o «tumor» o «hiperproliferativo» se refieren a la presencia de células que poseen características típicas de células que causan cáncer, tales como proliferación no
30 controlada, inmortalidad, potencial invasivo o metastásico, tasa de multiplicación rápida y ciertos rasgos morfológicos característicos. En algunas modalidades, dichas células presentan

dichas características parcial o completamente debido a la expresión y actividad de proteínas de punto de control inmunitario, tales como PD-1, PD-L1, PD-L2 y/o CTLA-4.

Las células cancerosas a menudo están en forma de un tumor, pero dichas células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden ser una célula cancerosa que no forma tumor, tal como en un cáncer hematológico como leucemia. Como se usa en la presente, el término «cáncer» incluye cánceres premalignos, así como malignos. Los cánceres incluyen, de modo no taxativo, una variedad de cánceres, carcinoma que incluyen cáncer de la vejiga (que incluye cáncer de vejiga acelerado y metastásico), de mama, de colon (que incluye cáncer colorrectal), de riñón, hígado, pulmón (que incluye cáncer pulmonar microcítico y no microcítico y adenocarcinoma pulmonar), de ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (que incluye carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides y piel (que incluye carcinoma de células escamosas), tumores hematopoyéticos de linaje linfoide que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; otros tumores que incluyen melanoma, xenoderoma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma; melanoma, melanoma maligno no operable de estadio III o IV, carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer pancreático, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, cáncer óseo, tumores óseos, histiocitoma óseo fibroso maligno adulto, histiocitoma óseo fibroso maligno infantil, sarcoma, sarcoma pediátrico, linfoma extranodal NK, neoplasias, neoplasia de células plasmáticas; síndromes mielodisplásicos; neuroblastoma; tumor de células germinales testiculares, melanoma

intraocular, síndromes mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, sarcoma sinovial, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Filadelfia positivo (Ph+ ALL), mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado con

5 mastocitosis, y cualquier metástasis de estos. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en humanos, así como mastocitoma en perros y algunos subtipos raros como mastocitosis bullosa, eritrodérmica y telangiectásica, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado,

10 tal como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con mastocitosis, leucemia de mastocitos, además de otros cánceres. Otros cánceres también están incluidos dentro del alcance de los trastornos que incluyen, de modo no taxativo, los siguientes: carcinoma, que incluye el de la vejiga, carcinoma urotelial, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, testículos, particularmente seminomas testiculares, y piel; incluido el carcinoma de

15 células escamosas; tumores estromales gastrointestinales («GIST»); tumores hematopoyéticos del linaje linfoide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, que incluye leucemias mielógenas agudas y crónicas y

20 leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen

25 melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosos refractarios a quimioterapia y sarcoma de Kaposi, y cualquier metástasis de estos. Otros ejemplos no taxativos de tipos de cánceres aplicables a los métodos abarcados por la presente invención incluyen sarcomas y carcinomas humanos, p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma,

30 condrosarcoma, sarcoma osteógeno, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing,

leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, quistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de ducto biliar,

5 coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer óseo, tumor cerebral, cáncer testicular, carcinoma pulmonar (que incluye adenocarcinoma pulmonar), carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma;

10 leucemias, p. ej., leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica); y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no hodgkiniana), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y enfermedad de cadena pesada. En algunas modalidades, los cánceres son

15 de naturaleza epitelial e incluyen, de modo no taxativo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cánceres ginecológicos, cáncer renal, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata o cáncer de piel. En algunas modalidades, el cáncer epitelial es cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales no papilar, carcinoma de

20 cuello uterino, carcinoma de ovario (p. ej., carcinoma de ovario seroso) o carcinoma de mama. Los cánceres epiteliales se pueden caracterizar de varios otros modos que incluyen, pero no se limitan a, seroso, endometriode, mucinoso, de células claras, de Brenner o indiferenciado. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pulmonar no microcítico (avanzado), melanoma, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello,

25 cáncer de vejiga urotelial (avanzado), cáncer de riñón (avanzado) (RCC), cáncer microsatelital de alta inestabilidad, linfoma de Hodgkin clásico, cáncer gástrico (avanzado), cáncer de cuello uterino (avanzado), linfoma de células B mediastinal primario, carcinoma hepatocelular (avanzado), cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma invasivo de mama, carcinoma urotelial de vejiga y carcinoma de células de merkel (avanzado).

30 Además, las composiciones descritas en la presente también se pueden administrar en terapia de combinación para modular adicionalmente una actividad deseada. Los agentes adicionales

incluyen, sin limitaciones, agentes quimioterapéuticos, hormonas, antiangiogénicos, compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. Los métodos de tratamiento anteriores se pueden administrar junto con otras formas de terapia convencional (por ejemplo, tratamientos estándar de atención para el cáncer bien conocidos por el experto en la técnica), ya sea consecutivamente con terapia pre o post-convencional. Por ejemplo, estos agentes moduladores se pueden administrar con una dosis terapéuticamente eficaz de agente quimioterapéutico. En otra modalidad, estos agentes moduladores se administran junto con quimioterapia para mejorar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico. El Physicians' Desk Reference (PDR, por sus siglas en inglés) describe dosificaciones de agentes quimioterapéuticos que se han usado en el tratamiento de varios cánceres. El régimen de dosificación y dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerán del melanoma particular, que se esté tratando, el grado de la enfermedad y otros factores familiares para el médico experto en la técnica y pueden ser determinados por el médico.

La terapia usando una o más composiciones descritas en la presente, ya sea sola o en combinación con otras terapias, tal como terapias contra el cáncer, se puede usar para ponerse en contacto con células que expresan MAGEA1 y/o administrarse a un sujeto deseado, tal como un sujeto que está indicado como un probable respondedor a la terapia. En otra modalidad, esta terapia se puede evitar una vez que se indica que un sujeto no responde probablemente a la terapia (por ejemplo, según se evalúa de acuerdo con un método de diagnóstico o pronóstico descrito en la presente) y se puede recomendar y/o administrar un régimen de tratamiento alternativo, tal como terapias contra el cáncer dirigidas y/o no dirigidas. La expresión «terapia dirigida» se refiere a la administración de agentes que interaccionan selectivamente con una biomolécula elegida para tratar de ese modo el cáncer. Por ejemplo, la terapia dirigida con respecto a la inhibición del inhibidor de punto de control inmunitario es útil en combinación con los métodos abarcados por la presente invención.

El término «inmunoterapia» o «inmunoterapias» en general se refiere a cualquier estrategia para modular una respuesta inmunitaria de una manera beneficiosa y abarca el tratamiento de un sujeto aquejado de, o en riesgo de contraer o sufrir una recurrencia de, una enfermedad mediante un método que comprende inducir, potenciar, suprimir o modificar de otro modo una respuesta inmunitaria, así como cualquier tratamiento que use ciertas partes del sistema

inmunitario de un sujeto para combatir enfermedades, tal como cáncer. El propio sistema inmunitario del sujeto se estimula (o suprime), con o sin administración de uno o más agentes para ese propósito. Las inmunoterapias que están diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmune se denominan «inmunoterapias de activación». Las inmunoterapias que se diseñan para reducir o suprimir una respuesta inmunitaria se denominan «inmunoterapias de supresión». En algunas modalidades, una inmunoterapia es específica para células de interés, tal como células cancerosas. En algunas modalidades, la inmunoterapia puede ser «no dirigida», que se refiere a la administración de agentes que no interactúan selectivamente con las células del sistema inmunitario, pero modulan la función del sistema inmunitario. Los ejemplos representativos de terapias no dirigidas incluyen, de modo no taxativo, quimioterapia, terapia génica y terapia con radiación.

Algunas formas de inmunoterapia son terapias dirigidas que pueden comprender, por ejemplo, el uso de vacunas contra el cáncer y/o células presentadoras de antígenos sensibilizadas. Por ejemplo, un virus oncolítico es un virus que es capaz de infectar y lisar células cancerosas, mientras no daña las células normales, lo que lo hace potencialmente útil en la terapia para el cáncer. La replicación de virus oncolíticos facilita la destrucción de linfocitos tumorales y también produce la amplificación de la dosis en el sitio del tumor. También pueden actuar como vectores para genes anticancerígenos, lo que les permite suministrarse específicamente al sitio del tumor. La inmunoterapia puede implicar la inmunidad pasiva para la protección a corto plazo de un hospedador, lograda mediante la administración de un anticuerpo preformado dirigido contra un antígeno del cáncer o antígeno de la enfermedad (p. ej., administración de un anticuerpo monoclonal, opcionalmente enlazado con un agente quimioterapéutico o toxina, a un antígeno tumoral). La inmunoterapia también se puede centrar en el uso de epítopos reconocidos por linfocitos citotóxicos de líneas celulares cancerosas. Alternativamente, se pueden usar polinucleótidos de antisentido, ribozimas, moléculas de interferencia por ARN, polinucleótidos de triple hélice y similares, para modular selectivamente biomoléculas que están enlazadas con la iniciación, progresión y/o patología de un tumor o cáncer. De manera similar, la inmunoterapia puede tomar la forma de terapias basadas en células. Por ejemplo, la inmunoterapia celular adoptiva es un tipo de inmunoterapia que utiliza células inmunitarias, tal como células T, que tienen una reactividad natural o genéticamente modificada al cáncer de un paciente y se generan y luego se transfieren de nuevo al paciente con cáncer. La

inyección de un gran número de células T específicas de tumor activadas puede inducir una regresión completa y duradera de los cánceres.

La inmunoterapia puede implicar inmunidad pasiva para protección a corto plazo de un hospedador, lograda mediante la administración de anticuerpo preformado dirigido contra un antígeno de cáncer o antígeno de enfermedad (por ejemplo, administración de un anticuerpo monoclonal, opcionalmente unido a un agente quimioterapéutico o toxina, a un antígeno tumoral). La inmunoterapia también se puede centrar en el uso de epítomos reconocidos por linfocitos citotóxicos de líneas celulares cancerosas. Alternativamente, se pueden usar polinucleótidos de antisentido, ribozimas, moléculas de interferencia por ARN, polinucleótidos de triple hélice y similares, para modular selectivamente biomoléculas que están enlazadas con la iniciación, progresión y/o patología de un tumor o cáncer.

En algunas modalidades, un agente inmunoterapéutico es un agonista de una molécula inmunoestimulante; un antagonista de una molécula inmunoinhibidora; un antagonista de una quimiocina; un agonista de una citocina que estimula la activación de células T; un agente que antagoniza o inhibe una citocina que inhibe la activación de células T; y/o un agente que se une a una proteína unida a membrana de la familia B7. En algunas modalidades, el agente inmunoterapéutico es un antagonista de una molécula inmuno-inhibidora. En algunas modalidades, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser agentes para citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes que neutralizan el efecto inhibidor de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento asociados a tumores y otros factores solubles, que incluyen IL-10, TGF- β y VEGF.

En algunas modalidades, la inmunoterapia comprende inhibidores de uno o más puntos de control inmunitario. La expresión «punto de control inmunitario» se refiere a un grupo de moléculas en la superficie celular de células T CD4+ y/o CD8+ que ajustan con precisión las respuestas inmunitarias modulando las respuestas inmunitarias contra el cáncer, tal como modulando a la baja o inhibiendo una respuesta inmunitaria contra el tumor. Las proteínas de punto de control inmunitario son bien conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, ICOS, HVEM, PD-L2, CD200R, CD160, gp49B, PIR-B, KRLG-1, receptores de la familia KIR, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3 (CD223), IDO, GITR, 4-1BB, OX-40, BTLA, SIRPalfa (CD47), CD48, 2B4 (CD244), B7.1, B7.2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, HHLA2, butirofilinas y A2aR (ver, por ejemplo, el documento WO 2012/177624). El

término abarca además fragmentos de proteínas biológicamente activas, así como ácidos nucleicos que codifican para proteínas de punto de control inmunitario de longitud completa. Algunos puntos de control inmunitarios son «puntos de control inmunitarios inmunoinhibidores» que abarcan moléculas (por ejemplo, proteínas) que inhiben, regulan

5 negativamente o suprimen una función del sistema inmunitario (por ejemplo, una respuesta inmunitaria). Por ejemplo, PD-L1 (ligando de muerte programada 1), también conocido como CD274 o B7-H1, es una proteína que transmite una señal inhibidora que reduce la proliferación de células T para suprimir el sistema inmunitario. CTLA-4 (proteína citotóxica 4 asociada a

10 linfocitos T), también conocida como CD152, es un receptor de proteína en la superficie de células presentadoras de antígeno que sirve como punto de control inmunitario (interruptor de «apagado») para disminuir de forma regulada las respuestas inmunitarias. TIM-3 (inmunoglobulina de células T y dominio de mucina que contiene 3), también conocido como HAVCR2, es una proteína de superficie celular que sirve como punto de control inmunitario para regular la activación de macrófagos. VISTA (supresor de Ig de dominio V de activación

15 de células T) es una proteína transmembrana de tipo I que funciona como un punto de control inmunitario para inhibir la función efectora de células T y mantener la tolerancia periférica. LAG-3 (gen de activación de linfocitos 3) es un receptor de punto de control inmunitario que regula negativamente la proliferación, activación y homeostasis de células T. BTLA (atenuador de linfocitos B y T) es una proteína que muestra inhibición de células T a través de

20 interacciones con receptores de la familia de necrosis tumoral (TNF-R). KIR (receptor similar a inmunoglobulina de células aniquiladoras) es una familia de proteínas expresadas en células NK, y una minoría de células T, que suprimen la actividad citotóxica de las células NK. En algunas modalidades, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser agentes específicos para enzimas inmunosupresoras tal como inhibidores que pueden bloquear las actividades de

25 arginasa (ARG) e indoleamina 2,3-dioxigenasa (ido), una proteína de punto de control inmunitario que suprime células T y células NK, que cambian el catabolismo de los aminoácidos arginina y triptófano en el microambiente tumoral inmunosupresor. Los inhibidores pueden incluir, pero no se limitan a, N-hidroxi-L-Arg (NOHA) dirigido a macrófagos M2 que expresan ARG, nitroaspirina o sildenafil (Viagra®), que bloquea ARG y óxido nítrico

30 sintasa (NOS) simultáneamente; e inhibidores de IDO, tal como 1-metil-triptófano. El término abarca, además, un fragmento proteico biológicamente activo, así como ácidos nucleicos que

codifican proteínas de punto de control inmunitario de longitud completa y fragmentos proteicos biológicamente activos de estas. En alguna modalidad, el término abarca, además, cualquier fragmento según las descripciones de homología proporcionadas en la presente.

Por el contrario, otros puntos de control inmunitario son «inmunoestimulantes» que abarcan moléculas (por ejemplo, proteínas) que activan, estimulan o promueven una función del sistema inmunitario (por ejemplo, una respuesta inmunitaria). En algunas modalidades, la molécula inmunoestimulante es CD28, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), CD27, CD70, CD40, CD40L, CD122, CD226, CD30, CD30L, OX40, OX40L, HVEM, BTLA, GITR y su ligando GITRL, LIGHT, LT β R, LT $\alpha\beta$, ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2) y NKG2D. CD40 (agrupación de diferenciación 40) es una proteína coestimulante que se encuentra en células presentadoras de antígenos que se requiere para su activación. OX40, también conocido como miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral 4 (TNFRSF4) o CD134, está implicado en el mantenimiento de una respuesta inmunitaria después de la activación mediante la prevención de la muerte de células T y, posteriormente, el aumento de la producción de citocinas. CD137 es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) que co-estimula células T activadas para potenciar la proliferación y supervivencia de células T. CD122 es una subunidad de la proteína receptora de interleucina-2 (IL-2), que promueve la diferenciación de células T inmaduras en células T reguladoras, efectoras o de memoria. CD27 es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y sirve como una molécula de punto de control inmunitario coestimulante. CD28 (agrupación de diferenciación 28) es una proteína expresada en células T que proporciona señales coestimulantes requeridas para la activación y supervivencia de células T. GITR (proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides), también conocida como TNFRSF18 y AITR, es una proteína que desempeña un papel clave en la autotolerancia inmunológica dominante mantenida por células T reguladoras. ICOS (coestimulante inducible de células T), también conocido como CD278, es una molécula coestimulante de la superfamilia CD28 que se expresa en células T activadas y desempeña un papel en la señalización de células T y respuestas inmunitarias.

Los puntos de control inmunitarios y sus secuencias son bien conocidos en la técnica y las modalidades representativas se describen adicionalmente a continuación. Los puntos de control inmunitarios se refieren en general a pares de receptores inhibidores y los compañeros

de unión naturales (por ejemplo, ligandos). Por ejemplo, los polipéptidos PD-1 son receptores inhibidores capaces de transmitir una señal inhibidora a una célula inmunitaria para inhibir de ese modo la función efectora de células inmunitarias, o son capaces de promover la coestimulación (por ejemplo, mediante inhibición competitiva) de células inmunitarias, por ejemplo, cuando están presentes en forma monomérica soluble. Los miembros preferidos de la familia PD-1 comparten identidad de secuencia con PD-1 y se unen a uno o más miembros de la familia B7, por ejemplo, B7-1, B7-2, ligando de PD-1 y/u otros polipéptidos en células presentadoras de antígeno. El término «actividad de PD-1» incluye la capacidad de un polipéptido de PD-1 para modular una señal inhibidora en una célula inmunitaria activada, por ejemplo, mediante el acoplamiento de un ligando de PD-1 natural en una célula presentadora de antígeno. La modulación de una señal inhibidora en una célula inmunitaria provoca la modulación de la proliferación y/o la secreción de citocinas por una célula inmunitaria. Por lo tanto, el término «actividad de PD-1» incluye la capacidad de un polipéptido de PD-1 para unirse a uno o más de sus ligandos naturales, la capacidad de modular señales inhibidoras de células inmunitarias y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria. El término «ligando de PD-1» se refiere a parejas de unión del receptor de PD-1 e incluye tanto PD-L1 (Freeman et ál. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027-1034) y PD-L2 (Latchman et ál. (2001) *Nat. Immunol.* 2:261). El término «actividad de ligando de PD-1» incluye la capacidad de un polipéptido de ligando de PD-1 para unirse a uno o más de sus receptores naturales (por ejemplo, PD-1 o B7-1), la capacidad de modular señales inhibidoras de células inmunitarias y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

Como se usa en la presente, el término «terapia de punto de control inmunitario» se refiere al uso de agentes que inhiben los puntos de control inmunitarios inmunoinhibidores, tal como la inhibición de sus ácidos nucleicos y/o proteínas. La inhibición de uno o más de estos puntos de control inmunitarios puede bloquear o neutralizar de otro modo la señalización inhibidora para aumentar de forma regulada de ese modo una respuesta inmunitaria con el fin de tratar más eficazmente el cáncer. Los agentes de ejemplo útiles para inhibir los puntos de control inmunitarios incluyen anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, ligandos naturales y derivados de ligandos naturales, que pueden unirse y/o inactivar o inhibir proteínas de puntos de control inmunitarios, o fragmentos de las mismas; así como interferencia de ARN, antisentido, aptámeros de ácidos nucleicos, etc. que pueden disminuir de forma regulada la

expresión y/o actividad de ácidos nucleicos de puntos de control inmunitarios, o fragmentos de los mismos. Los agentes de ejemplo para aumentar de forma regulada una respuesta inmunitaria incluyen anticuerpos contra una o más proteínas de punto de control inmunitario que bloquean la interacción entre las proteínas y su receptor o receptores naturales; una forma no activante de una o más proteínas de punto de control inmunitario (por ejemplo, un polipéptido negativo dominante); moléculas pequeñas o péptidos que bloquean la interacción entre una o más proteínas de punto de control inmunitario y su receptor o receptores naturales; proteínas de fusión (por ejemplo, la porción extracelular de una proteína de inhibición de punto de control inmunitario fusionada a la porción Fc de un anticuerpo o inmunoglobulina) que se unen a su receptor o receptores naturales; moléculas de ácido nucleico que bloquean la transcripción o traducción de ácido nucleico de punto de control inmunitario; y similares. Estos agentes pueden bloquear directamente la interacción entre el uno o más puntos de control inmunitarios y su uno o más receptores naturales (por ejemplo, anticuerpos) para prevenir la señalización inhibidora y aumentar de forma regulada una respuesta inmunitaria.

Alternativamente, los agentes pueden bloquear indirectamente la interacción entre una o más proteínas de punto de control inmunitario y su uno o más receptores naturales para prevenir la señalización inhibidora y aumentar de forma regulada una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, una versión soluble de un ligando de proteína de punto de control inmunitario tal como un dominio extracelular estabilizado se puede unir a su receptor para reducir indirectamente la concentración eficaz del receptor para unirse a un ligando apropiado. En una modalidad, se usan anticuerpos contra PD-1, anticuerpos contra PD-L1 y/o anticuerpos contra PD-L2, ya sea solos o en combinación, para inhibir los puntos de control inmunitarios. Los agentes terapéuticos usados para bloquear la vía de PD-1 incluyen anticuerpos antagonistas y ligandos de PD-L1 solubles. Los agentes antagonistas contra la vía inhibidora de PD-1 y PD-L1/2 pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos antagonistas contra PD-1 o PD-L1/2 (por ejemplo, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 (también conocido como nivolumab o BMS-936558), 4A11, 7D3 y 5F4 descritos en la patente de Estados Unidos n.º 8,008,449; AMP-224, pidilizumab (CT-011), pembrolizumab y anticuerpos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 8,779,105; 8,552,154; 8,217,149; 8,168,757; 8,008,449; 7,488,802; 7,943,743; 7,635,757 y 6,808,710. De manera similar, inhibidores de puntos de control representativos adicionales pueden ser, pero no se limitan a, anticuerpos contra el regulador inhibidor CTLA-4 (antígeno de infocito T anti-

citotóxico 4 antígeno de linfocito T anti-citotóxico 4), tal como ipilimumab, tremelimumab (completamente humanizado), anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA-4, anticuerpos anti-dominio-CTLA-4, fragmentos de anticuerpo anti-CTLA-4 de cadena individual, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena pesada, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena ligera y otros anticuerpos, tal como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 8,748, 815; 8,529,902; 8,318,916; 8,017,114; 7,744,875; 7,605,238; 7,465,446; 7,109,003; 7,132,281; 6,984,720; 6,682,736; 6,207,156; y 5,977,318, así como la patente europea n.º 1212422, Publicación de Patentes de Estados Unidos n.º 2002/0039581 y 2002/086014, y Hurwitz et ál. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:10067-10071.

- 10 Las definiciones representativas de actividad de punto de control inmunitario, ligando, bloqueo, y similares ejemplificadas para PD-1, PD-L1, PD-L2, y CTLA-4 se aplican en general a otros puntos de control inmunitarios.

El término «terapia no dirigida» se refiere a la administración de agentes que no interactúan selectivamente con una biomolécula elegida pero que tratan el cáncer. Los ejemplos representativos de terapias no dirigidas incluyen, de modo no taxativo, quimioterapia, terapia génica y terapia con radiación.

- En una modalidad, se usa quimioterapia. La quimioterapia incluye la administración de un agente quimioterapéutico. Este agente quimioterapéutico puede ser, pero no se limita a, los seleccionados de entre los siguientes grupos de compuestos: compuestos de platino, antibióticos citotóxicos, antimetabolitos, agentes antimitóticos, agentes alquilantes, compuestos de arsénico, inhibidores de ADN topoisomerasa, taxanos, análogos de nucleósidos, alcaloides vegetales y toxinas; y derivados sintéticos de los mismos. Los agentes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes: mostazas de nitrógeno (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, clorambucilo, estramustina y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU)), alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfano y treosulfano), triazenos (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida), cisplatino, treosulfano y trofosfamida; alcaloides vegetales: vinblastina, paclitaxel, docetaxol; inhibidores de ADN topoisomerasa: tenipósido, crisnatol y mitomicina; anti-folatos: metotrexato, ácido micofenólico e hidroxiurea; análogos de pirimidina: 5-fluorouracilo, doxifluridina y citosina arabinósido; análogos de purina: mercaptopurina y tioguanina; antimetabolitos de ADN: 2'-desoxi-5-fluorouridina, glicinato de afidicolina y pirazoloimidazol; y

agentes antimitóticos: halicondrina, colquicina y rhizoxina. De manera similar, otros ejemplos de agentes que incluyen compuestos que contienen platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), taxoides (por ejemplo, paclitaxel o un equivalente de paclitaxel como nanopartículas unidas a albúmina paclitaxel (ABRAXANE), paclitaxel combinado con ácido docosahexaenoico (DHA-paclitaxel, taxoprexina), paclitaxel combinado con poliglutamato (PG-paclitaxel, paclitaxel poliglumex, CT-2103, XYOTAX), profármaco activado por tumores (TAP) ANG1005 (Angiopep-2 unido a tres moléculas de paclitaxel), paclitaxel-EC-1 (paclitaxel unido al péptido EC-1 que reconoce erbB2) y paclitaxel conjugado con glucosa, por ejemplo, 2'-paclitaxel metil 2-glucopiranosilsuccinato; docetaxel, taxol), epipodofilinas (por ejemplo, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, topotecán, 9-aminocamptotecina, camptoirinotecán, irinotecán, crisnatol, mitomicina C), antimetabolitos, inhibidores de DHFR (por ejemplo, metotrexato, diclorometotrexato, trimetrexato, edatrexato), inhibidores de la IMP deshidrogenasa (por ejemplo, ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina y EICAR), inhibidores de la ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiaurea y deferoxamina), análogos de uracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina, doxifluridina, ratitrexed, tegafur- uracilo, capecitabina), análogos de citosina (por ejemplo, citarabina (ara C), arabinósido de citosina y fludarabina), análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina y tioguanina), análogos de vitamina D3 (por ejemplo, EB 1089, CB 1093 y KH 1060), inhibidores de la isoprenilación (por ejemplo, lovastatina), neurotoxinas dopaminérgicas (por ejemplo, ion 1-metil-4-fenilpiridinio), inhibidores del ciclo celular (por ejemplo, estaurosporina), actinomicina (por ejemplo, actinomicina D, dactinomicina), bleomicina (por ejemplo, bleomicina A2, bleomicina B2, peplomicina), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, doxorrubicina liposomal pegilada, idarrubicina, epirubicina, pirarrubicina, zorrubicina, mitoxantrona), inhibidores de MDR (por ejemplo, verapamilo), inhibidores de la ATPasa Ca^{2+} (por ejemplo, tapsigargina), imatinib, talidomida, lenalidomida, inhibidores de la tirosina cinasa (por ejemplo, axitinib (AG013736), bosutinib (SKI-606), cediranib (RECENTINTM, AZD2171), dasatinib (SPRYCEL[®], BMS-354825), erlotinib (TARCEVA[®]), gefitinib (IRESSA[®]), imatinib (Gleevec[®], CGP57148B, STI-571), lapatinib (TYKERB[®], TYVERB[®]), lestaurtinib (CEP-701), neratinib (HKI-272), nilotinib (TASIGNA[®]), semaxanib (semaxinib, SU5416), sunitinib (SUTENT[®], SU11248), toceranib (PALLADIA[®]), vandetanib (ZACTIMA[®], ZD6474), vatalanib (PTK787, PTK/ZK), trastuzumab

(HERCEPTIN®), bevacizumab (AVASTIN®), rituximab (RITUXAN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), ranibizumab (Lucentis®), nilotinib (TASIGNA®), sorafenib (NEXAVAR®), everolimus (AFINITOR®), alemtuzumab (CAMPATH®), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), temsirolimus (TORISEL®), ENMD-2076, PCI-32765 , AC220, lactato de dovitinib (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, tivozanib (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647 y/o XL228), proteasoma inhibidores (p. ej., bortezomib (VELCADE®)), Inhibidores de mTOR (por ejemplo, rapamicina, temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD-001), ridaforolimus, AP23573 (Ariad), AZD8055 (AstraZeneca), BEZ235 (Novartis), BGT226 (Novartis), XL765 (Sanofi Aventis), PF -4691502 (Pfizer), GDC0980 (Genentech), SF1126 (Semafoe) y OSI-027 (OSI)), oblimersen, gemcitabina, carminomicina, leucovorina, pemetrexed, ciclofosfamida, dacarbazina, procarbina, prednisolona, dexametasona, campatecina, plicamicina, asparaginasa, aminopterina, metopterina, porfiromicina, melfalán, leurosidina, leurosina, clorambucilo, trabectedina, procarbina, discodermolida, carminomicina, aminopterina y hexametilmelamina. También se pueden usar composiciones que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, FLAG, CHOP). FLAG comprende fludarabina, citosina arabinósido (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona. En otra modalidad, se usan inhibidores de PARP (por ejemplo, PARP-1 y/o PARP-2) y estos inhibidores son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Olaparib, ABT-888, BSI-201, BGP-15 (N-Gene Research Laboratories, Inc.); INO-1001 (Inotek Pharmaceuticals Inc.); PJ34 (Soriano et ál., 2001; Pacher et ál., 2002b); 3-aminobenzamida (Trevigen); 4-amino-1,8-naftalimida; (Trevigen); 6(5H)-fenantridinona (Trevigen); benzamida (Patentes de Estados Unidos Re. 36,397); y NU1025 (Bowman et ál.). El mecanismo de acción está generalmente relacionado con la capacidad de los inhibidores de PARP para unirse a PARP y disminuir su actividad. PARP cataliza la conversión de beta-nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en nicotinamida y poli-ADP-ribosa (PAR). Tanto poli(ADP-ribosa) como PARP se han vinculado a la regulación de la transcripción, proliferación celular, estabilidad genómica y carcinogénesis (Bouchard et. ál. (2003) *Exp. Hematol.* 31:446-454); Herceg (2001) *Mut. Res.* 477:97-110). La poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) es una molécula clave en la reparación de cortes monocatenarios de

ADN (SSB, por sus siglas en inglés) (de Murcia J. *et ál.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7303-7307; Schreiber *et ál.* (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:517-528; Wang *et ál.* (1997) *Genes Dev.* 11:2347-2358). La inactivación de la reparación de SSB mediante la inhibición de la función de PARP1 induce cortes bicatenarios de ADN (DSB, por sus siglas en inglés) que puede desencadenar la letalidad sintética en células cancerosas con reparación de DSB dirigida por homología defectuosa (Bryant *et ál.* (2005) *Nature* 434:913-917; Farmer *et ál.* (2005) *Nature* 434:917-921). Los ejemplos anteriores de agentes quimioterapéuticos son ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

En otra modalidad, se usa terapia con radiación. La radiación usada en la terapia con radiación puede ser radiación ionizante. La terapia con radiación también pueden ser rayos gamma, rayos X o haces de protones. Los ejemplos de terapia con radiación incluyen, pero no se limitan a, terapia con radiación con haz externo, implantación intersticial de radioisótopos (I-125, paladio, iridio), radioisótopos tales como estroncio-89, terapia con radiación torácica, terapia con radiación intraperitoneal P-32 y/o terapia con radiación abdominal y pélvica total. Para acceder a una descripción general de la terapia con radiación, ver Hellman, Capítulo 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6a edición, 2001, DeVita et al., eds., J. B. Lippencott Company, Filadelfia. La terapia con radiación se puede administrar como radiación con haz externo o teleterapia en donde la radiación se dirige desde una fuente remota. El tratamiento con radiación también se puede administrar como terapia interna o braquiterapia en donde se coloca una fuente radioactiva dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o una masa tumoral. También se contempla el uso de terapia fotodinámica que comprende la administración de fotosensibilizadores, tales como hematoporfirina y sus derivados, Vertoporfir (BPD-MA), ftalocianina, fotosensibilizador Pc4, demetoxi-hipocreлина A; y 2BA-2-DMHA.

En otra modalidad, se usa terapia hormonal. Los tratamientos terapéuticos hormonales pueden comprender, por ejemplo, agonistas hormonales, antagonistas hormonales (p. ej., flutamida, bicalutamida, tamoxifeno, raloxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON), antagonistas de LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y procesamiento hormonal y esteroides (p. ej., dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progestinas), derivados de vitamina A (p. ej., ácido retinoico todo trans (ATRA, por sus siglas

en inglés)); análogos de vitamina D3; antigestágenos (p. ej., mifepristona, onapristona) o antiandrógenos (p. ej., acetato de ciproterona).

- En aun otra modalidad, se usa hipertermia, un procedimiento en el que se expone tejido corporal a altas temperaturas (hasta 106 °F). El calor puede ayudar a encoger tumores al dañar las células o privarlas de sustancias que necesitan para vivir. La terapia de hipertermia puede ser con hipertermia local, regional y de todo el cuerpo, al usar dispositivos de calentamiento externos e internos. La hipertermia casi siempre se usa con otras formas de terapia (*p. ej.*, terapia por radiación, quimioterapia y terapia biológica) para intentar aumentar su eficacia. La hipertermia local se refiere a calor que se aplica a un área muy pequeña, tal como un tumor.
- El área se puede calentar externamente con ondas de alta frecuencia dirigidas a un tumor desde un dispositivo fuera del cuerpo. Para lograr el calentamiento interno, se puede usar uno de varios tipos de sondas estériles que incluyen alambres delgados que se calientan o tubos huecos que se llenan con agua caliente; antenas de microondas implantadas; y electrodos de radiofrecuencia. En la hipertermia regional, se calienta un órgano o una extremidad. Se colocan imanes y dispositivos que producen energía elevada sobre la región que se va a calentar. En otra estrategia, denominada perfusión, se retira un poco de la sangre del paciente, se calienta y después se bombea (por perfusión) a la región que se va a calentar internamente. Se usa calentamiento del cuerpo entero para tratar el cáncer metastásico que se ha extendido por el cuerpo. Se puede lograr al usar mantas de agua caliente, cera caliente, bobinas inductoras (como las de mantas eléctricas) o cámaras térmicas (similares a incubadoras grandes). La hipertermia no causa ninguna elevación marcada en efectos secundarios o complicaciones por radiación. Sin embargo, el calor aplicado directamente a la piel puede causar molestias o incluso dolor local significativo en aproximadamente la mitad de los pacientes tratados. También puede causar ampollas, que generalmente se curan rápidamente.
- En aun otra modalidad, se usa terapia fotodinámica (también llamada PDT, terapia de fotorradiación, fototerapia o fotoquimioterapia) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Se basa en el descubrimiento de que ciertas sustancias químicas conocidas como agentes fotosensibilizantes pueden destruir organismos unicelulares cuando los organismos se exponen a un tipo de luz particular. La PDT destruye las células cancerosas a través del uso de una luz láser de frecuencia fija en combinación con un agente fotosensibilizante. En la PDT, el agente fotosensibilizante se inyecta en el torrente circulatorio y lo absorben células en todo

el cuerpo. El agente permanece en células cancerosas durante un tiempo más prolongado que en células normales. Cuando las células cancerosas tratadas se exponen a luz láser, el agente fotosensibilizante absorbe la luz y produce una forma activa de oxígeno que destruye las células cancerosas tratadas. La exposición a la luz se debe cronometrar cuidadosamente para que se produzca cuando la mayor parte del agente fotosensibilizante ya no está en las células sanas, pero todavía está presente en las células cancerosas. La luz láser usada en PDT se puede dirigir a través de una fibra óptica (una fibra de vidrio muy delgada). La fibra óptica se coloca cerca del cáncer para suministrar la cantidad adecuada de luz. La fibra óptica se puede dirigir a través de un broncoscopio en los pulmones para el tratamiento del cáncer de pulmón o a través de un endoscopio en el esófago para el tratamiento del cáncer de esófago. Una ventaja de la PDT es que causa un daño mínimo al tejido sano. Sin embargo, debido a que la luz láser que se usa actualmente no puede pasar a través de más de aproximadamente 3 centímetros de tejido (un poco más de una pulgada y un octavo), la PDT se usa principalmente para tratar tumores sobre o apenas por debajo de la piel o sobre el revestimiento de los órganos internos. La terapia fotodinámica hace que la piel y los ojos sean sensibles a la luz durante 6 semanas o más después del tratamiento. Se aconseja a los pacientes evitar la luz solar directa y la luz brillante en interiores durante al menos 6 semanas. Si los pacientes deben salir al exterior, deben usar vestimenta protectora, incluidos lentes de sol. Otros efectos secundarios temporales de la PDT se relacionan con el tratamiento de áreas específicas y pueden incluir tos, dificultad para tragar, dolor abdominal y respiración dolorosa o falta de aliento. En diciembre de 1995, la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó un agente fotosensibilizante denominado porfímero de sodio, o Photofrin®, para aliviar los síntomas del cáncer de esófago que causa una obstrucción y para el cáncer de esófago que no se puede tratar satisfactoriamente solo con láseres. En enero de 1998, la FDA aprobó el porfímero de sodio para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico precoz en pacientes para los cuales los tratamientos habituales para el cáncer de pulmón no son apropiados. El Instituto Nacional del Cáncer y otras instituciones respaldan ensayos clínicos (estudios de investigación) para evaluar el uso de terapia fotodinámica para varios tipos de cáncer, incluidos cánceres de vejiga, cerebro, laringe y cavidad bucal. En aun otra modalidad, se usa terapia con láser para emplear luz de alta intensidad para destruir células cancerosas. Esta técnica se usa a menudo para aliviar los síntomas del cáncer,

tales como hemorragia u obstrucción, especialmente cuando el cáncer no se puede curar mediante otros tratamientos. También se puede usar para tratar el cáncer al encoger o destruir tumores. El término «láser» significa amplificación de luz mediante emisión de radiación estimulada. La luz normal, tal como la del tubo de luz, tiene muchas longitudes de onda y se extiende en todas las direcciones. La luz láser, por otro lado, tiene una longitud de onda específica y se enfoca en un haz estrecho. Este tipo de luz de alta intensidad contiene mucha energía. Los láseres son muy potentes y se pueden usar para cortar acero o dar forma a diamantes. Los láseres también se pueden usar para trabajo quirúrgico preciso, tal como la reparación de la retina dañada en el ojo o el corte de tejido (en lugar de un bisturí). Aunque existen diferentes clases de láseres, solo tres clases se usan ampliamente en medicina: Láser de dióxido de carbono (CO₂) -- Este tipo de láser puede eliminar capas delgadas de la superficie de la piel sin penetrar las capas más profundas. Esta técnica es particularmente útil para tratar tumores que no se han extendido en profundidad en la piel y ciertas afecciones precancerosas. Como alternativa para la cirugía con bisturí tradicional, el láser de CO₂ también es capaz de cortar la piel. El láser se usa de este modo para eliminar cánceres de piel. Láser de neodimio:itrio-aluminio-garnet (Nd:YAG) -- La luz de este láser puede penetrar con mayor profundidad en tejido que la luz de otros tipos de láseres y puede causar que la sangre se coagule rápidamente. Se puede llevar a cabo a través de fibras ópticas en partes menos accesibles del cuerpo. Este tipo de láser se usa a veces para tratar cánceres de garganta. Láser de argón -- Este láser puede pasar solo a través de capas superficiales de tejido y es, por lo tanto, útil en dermatología y en cirugía ocular. Se usa también con tintes sensibles a la luz para tratar tumores en un procedimiento conocido como terapia fotodinámica (PDT). Los láseres tienen varias ventajas con respecto a las herramientas quirúrgicas estándares, que incluyen: Los láseres son más precisos que los bisturíes. El tejido cerca de una incisión se protege dado que existe poco contacto con la piel u otro tejido circundante. El calor producido mediante láseres esteriliza el sitio de la cirugía y se reduce, por lo tanto, el riesgo de infección. Se puede necesitar un tiempo de operación menor debido a que la precisión del láser permite una incisión más pequeña. El tiempo de curado a menudo se acorta; dado que el calor del láser sella los vasos sanguíneos, hay menos sangrado, hinchazón o cicatrices. La cirugía con láser puede ser menos complicada. Por ejemplo, con fibras ópticas, la luz láser se puede dirigir a partes del cuerpo sin hacer una incisión grande. Se pueden hacer más procedimientos de

manera ambulatoria. Los láseres se pueden usar en dos modos para tratar el cáncer: al encoger o destruir un tumor con calor o al activar una sustancia química, conocida como agente fotosensibilizante, que destruye las células cancerosas. En la PDT, se retiene un agente fotosensibilizante en células cancerosas y se puede estimular mediante luz para causar una reacción que destruye células cancerosas. Los láseres de CO₂ y Nd:YAG se usan para encoger o destruir tumores. Se pueden usar con endoscopios, tubos que permiten a los médicos ver en ciertas áreas del cuerpo, tales como la vejiga. La luz de algunos láseres se puede transmitir a través de un endoscopio flexible en el que se instalaron fibras ópticas. Esto permite a los médicos ver y trabajar en partes del cuerpo que de cualquier otra manera no se podrían alcanzar, excepto con cirugía y permite, por lo tanto, dirigir de manera muy precisa el haz de láser. Los láseres se pueden usar con microscopios de baja potencia, lo que da al médico una visión clara del sitio que se va a tratar. Al usarse con otros instrumentos, los sistemas de láser pueden producir un área de corte tan pequeña como de 200 micras de diámetro, menor que el ancho de un hilo muy fino. Los láseres se usan para tratar muchos tipos de cáncer. La cirugía con láser es un tratamiento estándar para ciertos estadios de cánceres de glotis (cuerda vocal), de cuello uterino, de piel, de pulmón, vaginal, vulvar y de pene. Además de su uso para destruir el cáncer, la cirugía láser también se usa para ayudar a aliviar los síntomas causados por el cáncer (cuidados paliativos). Por ejemplo, los láseres se pueden usar para encoger o destruir un tumor que bloquea la tráquea de un paciente (vía aérea) y facilitar así la respiración. También se usa a veces para paliar el cáncer colorrectal y anal. La termoterapia intersticial inducida por láser (LITT, por sus siglas en inglés) es uno de los desarrollos más recientes en la terapia con láser. La LITT usa la misma idea que un tratamiento para el cáncer denominada hipertermia; el calor puede ayudar a encoger tumores al dañar las células o privarlas de sustancias que necesitan para vivir. En este tratamiento, los láseres se dirigen a áreas intersticiales (áreas entre órganos) en el cuerpo. La luz láser después eleva la temperatura del tumor, que daña o destruye células cancerosas.

En un aspecto, en la presente se proporciona un método para provocar en un sujeto una respuesta inmunitaria a una célula que expresa MAGEA1. En algunas modalidades, el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente, en donde la composición farmacéutica, cuando se administra al sujeto, provoca una respuesta inmunitaria a la célula que expresa MAGEA1.

- En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta inmunitaria mediada por células. Una respuesta inmunitaria celular es una respuesta que involucra a las células T y puede determinarse in vitro, ex vivo, o in vivo. Por ejemplo, se puede determinar una respuesta inmunitaria celular general como la actividad proliferativa de células T en células (por ejemplo, leucocitos de sangre periférica (PBL)) muestreadas del sujeto en un momento adecuado después de la administración de una composición farmacéutica. Después de la incubación de, por ejemplo, PBMC con un estimulante durante un período apropiado, se puede determinar la incorporación de [³H]timidina. El subconjunto de células T que está proliferando se puede determinar usando citometría de flujo.
- 5 En otro aspecto abarcado por la presente invención, los métodos proporcionados en la presente incluyen la administración a mamíferos humanos y no humanos como se describió anteriormente. También se contemplan aplicaciones veterinarias. En algunas modalidades, el sujeto puede ser cualquier organismo vivo en el que se puede provocar una respuesta inmunitaria.
- 15 En algunas modalidades, la composición farmacéutica se puede administrar en cualquier momento que sea apropiado. Por ejemplo, la administración se puede realizar antes o durante el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, y continuarse después del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 se vuelve clínicamente indetectable. La administración también se puede continuar en un sujeto que muestra signos de recurrencia.
- 20 En algunas modalidades, la composición farmacéutica se puede administrar en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz. La administración de la composición farmacéutica al sujeto se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, y en dosificaciones y durante periodos de tiempo suficientes para lograr un efecto deseado.
- 25 En algunas modalidades, la composición farmacéutica se puede administrar al sujeto en cualquier sitio adecuado. La administración se puede realizar usando métodos en general conocidos en la técnica. Los agentes, incluyendo células, se pueden introducir en el sitio deseado por inyección directa, o por cualquier otro medio usado en la técnica que incluye, pero no se limita a, administración intravascular, intracerebral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, epidural, intraespinal, intraesternal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraarterial, intracardíaca o intramuscular. Por ejemplo, los sujetos de interés se pueden
- 30

injertar con las células trasplantadas por varias vías. Estas vías incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, administración subcutánea, administración a un tejido específico (por ejemplo, trasplante focal), inyección en la cavidad de la médula ósea del fémur, inyección en el bazo, administración bajo la cápsula renal del hígado fetal y similares. En ciertas modalidades, la vacuna contra el cáncer abarcada por la presente invención se inyecta al sujeto por vía intratumoral o subcutánea. Las células se pueden administrar en una infusión, o a través de infusiones sucesivas durante un período de tiempo definido suficiente para generar un efecto deseado. Los métodos de ejemplo para el trasplante, la evaluación del injerto y el análisis de fenotipado de marcadores de células trasplantadas son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Pearson et ál. (2008) *Curr. Protoc. Immunol.* 81:15.21.1-15.21.21; Ito et ál. (2002) *Blood* 100:3175-3182; Traggiai et ál. (2004) *Science* 304:104-107; Ishikawa et ál. *Blood* (2005) 106:1565-1573; Shultz et ál. (2005) *J. Immunol.* 174:6477-6489; y Holyoake et ál. (1999) *Exp. Hematol.* 27:1418-1427).

En algunas modalidades, la dosis se puede administrar en una cantidad y durante un período de tiempo eficaz para provocar una respuesta deseada, ya sea provocando la respuesta inmunitaria o el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o síntomas asociados con el mismo.

La composición farmacéutica se puede administrar después, precediendo o contemporáneamente con otras terapias, incluidas las terapias que también provocan una respuesta inmunitaria en el sujeto. Por ejemplo, el sujeto se puede tratar previa o concurrentemente con otras formas de agentes inmunomoduladores, estas otras terapias se pueden proporcionar de tal manera que no interfieran con la inmunogenicidad de las composiciones descritas en la presente.

La administración puede ser programada adecuadamente por el cuidador (por ejemplo, médico, veterinario) y puede depender de la condición clínica del sujeto, los objetivos de administración y/u otras terapias que también se contemplan o administran. En algunas modalidades, se puede administrar una dosis inicial y monitorear al sujeto para una respuesta inmunológica y/o clínica. Los medios adecuados de monitorización inmunológica incluyen el uso de linfocitos de sangre periférica (PBL) del paciente como respondedores y péptidos inmunogénicos o complejos de péptido-MHC descritos en la presente como estimulantes. También se puede determinar una reacción inmunológica mediante una respuesta inflamatoria

retardada en el sitio de administración. Se pueden administrar una o más dosis posteriores a la dosis inicial según sea apropiado, habitualmente de forma mensual, semestral o semanal, hasta que se logre el efecto deseado. A partir de entonces, se pueden administrar dosis de refuerzo o de mantenimiento adicionales según se requiera, particularmente cuando el beneficio inmunológico o clínico parece disminuir.

En general, una dosificación y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan las moléculas o células activas en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio. Esta respuesta se puede monitorear al establecer un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia completa o parcial o libre de enfermedad más prolongada) en sujetos tratados en comparación con sujetos no tratados. Los aumentos en las respuestas inmunitarias preexistentes a una proteína viral en general se correlacionan con un resultado clínico mejorado. Estas respuestas inmunitarias en general se pueden evaluar usando ensayos de proliferación, citotoxicidad o citoquinas estándar, que son rutinarios.

Para uso profiláctico, una dosis debe ser suficiente para prevenir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de una enfermedad asociada con la enfermedad o trastorno. El beneficio profiláctico de las composiciones inmunogénicas administradas de acuerdo con los métodos descritos en la presente se puede determinar mediante la realización de estudios preclínicos (incluidos estudios in vitro, ex vivo e in vivo en animales) y estudios clínicos y el análisis de los datos obtenidos de los mismos mediante métodos y técnicas estadísticos, biológicos y clínicos apropiados, todos los cuales pueden ser puestos en práctica fácilmente por un experto en la técnica.

Como se usa en la presente, la administración de una composición se refiere a la administración de la misma a un sujeto, independientemente de la vía o modo de administración. La administración se puede efectuar de forma continua o intermitente, y por vía parenteral. La administración puede ser para tratar a un sujeto ya confirmado como que tiene una condición, enfermedad o estado de enfermedad reconocido, o para tratar a un sujeto susceptible o en riesgo de desarrollar esta condición, enfermedad o estado de enfermedad. La coadministración con una terapia adyuvante puede incluir la distribución simultánea y/o secuencial de múltiples agentes en cualquier orden y en cualquier programa de dosificación (por ejemplo, células inmunitarias modificadas con una o más citocinas; terapia inmunosupresora tal como inhibidores de calcineurina, corticosteroides, inhibidores de

microtúbulos, dosis baja de un profármaco de ácido micofenólico o cualquier combinación de los mismos).

En algunas modalidades, se administra al sujeto una pluralidad de dosis de una célula hospedadora (por ejemplo, una célula inmunitaria modificada) descrita en la presente, que se puede administrar a intervalos entre administraciones de aproximadamente dos a aproximadamente cuatro semanas.

Los métodos de tratamiento o prevención abarcados por la presente invención se pueden administrar a un sujeto como parte de un curso o régimen de tratamiento, que puede comprender tratamientos adicionales antes o después de la administración de las dosis unitarias, células o composiciones descritas en la presente. Por ejemplo, en algunas modalidades, un sujeto que recibe una dosis unitaria de la célula hospedadora (por ejemplo, una célula inmunitaria modificada) está recibiendo o había recibido previamente un trasplante de células hematopoyéticas (HCT; incluyendo HCT mieloablativo y no mieloablativo). En cualquiera de las modalidades anteriores, una célula hematopoyética utilizada en un HCT puede ser una célula de «donante universal» que se modifica para reducir o eliminar la expresión de uno o más genes endógenos que codifican para un producto de polipéptido seleccionado de un MHC, antígeno y una proteína de unión (por ejemplo, por una inactivación de genes cromosómicos de acuerdo con los métodos descritos en la presente). En algunas modalidades,

Las técnicas y regímenes para realizar el trasplante de células se conocen en la técnica y pueden comprender el trasplante de cualquier célula donante adecuada, tal como una célula derivada de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica, una célula madre hematopoyética, una célula madre movilizada o una célula del líquido amniótico. Por consiguiente, en algunas modalidades, una célula hospedadora (por ejemplo, una célula inmunitaria modificada) abarcada por la presente descripción se puede administrar con o poco después de la terapia con células madre.

Los métodos abarcados por la presente invención pueden, en algunas modalidades, incluir además administrar uno o más agentes adicionales para tratar la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1) en una terapia de combinación. Por ejemplo, en algunas modalidades, una terapia de combinación comprende administrar una célula hospedadora o proteína de unión abarcada por la presente invención

con (concurrentemente, simultáneamente o secuencialmente) un agente antiviral. En algunas modalidades, una terapia de combinación comprende administrar una célula hospedadora o proteína de unión abarcada por la presente invención con lopinavir/ritonavir, cloroquina, ribavirina, fármacos esteroideos, hidroxiclороquina y/o interferón α . En algunas modalidades, una terapia de combinación comprende administrar una célula hospedadora, composición o dosis unitaria de las células hospedadoras abarcadas por la presente invención con una terapia secundaria, tal como una cirugía, un anticuerpo, una vacuna o cualquier combinación de los mismos.

10 c. Métodos de selección

Otro aspecto comprendido por la presente invención comprende análisis de selección.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para seleccionar agentes que se unen a un péptido inmunogénico de MAGEA1 o pMHC descrito en la presente. Por ejemplo, se proporciona un método para identificar una molécula de unión a péptidos, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que se une a un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1 que comprende: a) proporcionar una célula que presenta un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1 en el contexto de una molécula MHC en la superficie de la célula; b) determinar la unión de varias moléculas de unión a péptidos posibles o fragmentos de unión al antígeno de estas al epítipo peptídico en el contexto de la molécula MHC en la célula; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptidos o fragmentos de unión al antígeno de estas que se unen al epítipo peptídico en el contexto de la molécula MHC.

En algunas modalidades, se proporciona un método para identificar una molécula de unión a péptidos, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que se une a un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1 que comprende: a) proporcionar un epítipo peptídico ya sea solo o en un complejo de MHC-péptido estable, que comprende un epítipo peptídico seleccionado de las secuencias peptídicas enumeradas en la Tabla 1, ya sea solo o en el contexto de una molécula MHC; b) determinar la unión de varias moléculas de unión a péptidos posibles o fragmentos de unión al antígeno de estas al péptido o complejo de MHC-péptido estable; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptidos o fragmentos de unión al antígeno de estas que se unen al epítipo peptídico o el complejo de

MHC-péptido estable, opcionalmente donde el MHC o complejo de MHC-péptido es como se describe en la presente.

En algunas modalidades, en la presente se proporcionan métodos para identificar una molécula de unión a péptidos o fragmento de unión al antígeno de esta que se une a un epítipo peptídico seleccionado de la Tabla 1.

En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos (por ejemplo, molécula de unión a MHC-péptidos) es una molécula o parte de esta que posee la capacidad de unirse (por ejemplo, específica y/o selectivamente) a un epítipo peptídico que se presenta y muestra en el contexto de una molécula de MHC (complejo de MHC-péptido), tal como en la superficie de una célula. Ejemplos de moléculas de unión a péptidos incluyen receptores de células T o anticuerpos, o partes de unión al antígeno de estos, que incluyen regiones variables de inmunoglobulina de cadena simple (por ejemplo, scTCR, scFv) de estos, que presentan capacidad específica de unirse a un complejo de MHC-péptido. En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos es un TCR o un fragmento de unión a antígenos de este. En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos es un anticuerpo, tal como un anticuerpo tipo TCR o un fragmento de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos es un CAR tipo TCR que contiene un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, tal como un anticuerpo tipo TCR, tal como uno que se ha modificado genéticamente para unirse a complejos de MHC-péptido. En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos puede derivar de fuentes naturales, o puede producirse parcial o completamente de manera sintética o recombinante.

En algunas modalidades, una molécula de unión que se une a un epítipo peptídico se puede identificar poniendo en contacto una o más moléculas de unión a péptidos posibles, tales como una o más moléculas de TCR, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos posibles con un complejo de MHC-péptido, y evaluar si cada una de las moléculas de unión posibles se une (por ejemplo, específica y/o selectivamente) al complejo de MHC-péptido. Los métodos se pueden realizar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Se conocen métodos en la técnica para selección, tal como los que se describen en la publicación de patente estadounidense 2020/0102553.

En algunas modalidades, los métodos incluyen poner en contacto múltiples o una biblioteca de moléculas de unión, tal como múltiples o una biblioteca de TCR o anticuerpos, con un epítipo limitado a MHC e identificar o seleccionar moléculas que se unen específica y/o

selectivamente a dicho epítipo. En algunas modalidades, una biblioteca o colección que contiene múltiples moléculas de unión diferentes, tal como múltiples TCR diferentes o múltiples anticuerpos diferentes, se puede seleccionar o evaluar para la unión a un epítipo limitado a MHC. En algunas modalidades, tal como para la selección de una proteína de unión que se une específica y/o selectivamente a un péptido limitado a MHC, se pueden emplear métodos de hibridoma.

En algunas modalidades, se pueden emplear métodos de selección en los que múltiples moléculas de unión posibles, tal como múltiples o una colección de moléculas de unión posibles, se ponen en contacto individualmente con una molécula de unión a péptidos, ya sea simultánea o secuencialmente. Los miembros de biblioteca que se unen específica y/o selectivamente a un complejo de MHC-péptido particular se pueden identificar o seleccionar. En algunas modalidades, la biblioteca o colección de moléculas de unión posibles puede contener al menos 2, 5, 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o más moléculas de unión a péptidos diferentes.

En algunas modalidades, los métodos se pueden emplear para identificar a una molécula de unión a péptidos, tal como un TCR o un anticuerpo, que presenta la unión para más de un haplotipo de MHC o más de un alelo de MHC. En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos, tal como un TCR o anticuerpo, se une a o reconoce específica y/o selectivamente un epítipo peptídico presentado en el contexto de múltiples haplotipos o alelos de MHC clase I. En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos, tal como un TCR o anticuerpo, se une a o reconoce específica y/o selectivamente un epítipo peptídico presentado en el contexto de múltiples haplotipos o alelos de MHC clase II.

Una variedad de ensayos es bien conocida para evaluar la afinidad de unión y/o determinar si una molécula de unión se une específica y/o selectivamente a un ligando particular (por ejemplo, complejo MHC-péptido). Está dentro del nivel de un experto en la técnica determinar la afinidad de unión de un TCR para un epítipo de células T de un polipéptido diana, tal como al usar cualquiera de varios ensayos de unión que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, se puede usar una máquina Biacore® para determinar la constante de unión de un complejo entre dos proteínas. La constante de disociación (K_D) para el complejo se puede determinar al monitorear los cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo conforme se hace pasar el amortiguador sobre el chip. Otros ensayos

adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos tal como ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y radioinmunoabsorción (RIA), o determinación de la unión al monitorear el cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de las proteínas a través de fluorescencia, absorción UV, dicroísmo circular o resonancia magnética nuclear (NMR). Otros ensayos de ejemplo incluyen, de modo no taxativo, transferencia Western, ELISA, ultracentrifugación analítica, espectroscopía y análisis de resonancia de plasmones de superficie (Biacore®) (ver, por ejemplo, Scatchard et ál. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; Wilson (2002) *Science* 295:2103; Wolff et ál. (1993) *Cancer Res.* 53:2560; y patentes estadounidenses n.º 5,283,173, 5,468,614, o el equivalente), citometría de flujo, secuenciación y otros métodos para la detección de ácidos nucleicos expresados. En un ejemplo, la afinidad evidente por una TCR se mide al valorar la unión a diferentes concentraciones de tetrámeros, por ejemplo, por citometría de flujo usando tetrámeros etiquetados. En un ejemplo, la K_D aparente de una TCR se mide usando diluciones de 2 veces de tetrámeros marcados en un intervalo de concentraciones, seguido de la determinación de las curvas de unión por regresión no lineal, determinándose la K_D aparente como la concentración de ligando que produjo la mitad de la unión máxima.

En algunas modalidades, los métodos se pueden usar para identificar moléculas de unión que se unen solamente si el péptido particular está presente en el complejo, y no si el péptido particular está ausente o si otro péptido que no se superpone o no está relacionado está presente. En algunas modalidades, la molécula de unión no se une sustancialmente al MHC en ausencia del péptido unido, y/o no se une sustancialmente al péptido en ausencia del MHC. En algunas modalidades, las moléculas de unión son al menos parcialmente específicas. En algunas modalidades, una molécula de unión identificada ilustrativa puede unirse a un complejo de MHC-péptido si el péptido particular está presente, y también puede unirse si un péptido relacionado que tiene una o dos sustituciones con respecto al péptido particular está presente.

En algunas modalidades, un anticuerpo identificado, tal como un anticuerpo tipo TCR, se puede usar para producir o generar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un anticuerpo distinto de TCR que se une específica y/o selectivamente a un complejo de MHC-péptido.

En algunas modalidades, los métodos para identificar una molécula de unión a péptidos, tal

como un TCR o anticuerpo tipo TCR o CAR tipo TCR, se pueden usar para modificar células que expresan o contienen una molécula de unión a péptidos. En algunas modalidades, una célula o célula modificada es una célula T. En algunas modalidades, la célula T es una célula T CD4⁺ o CD8⁺. En algunas modalidades, la molécula de unión a péptidos reconoce un complejo de péptido de MHC clase I, un complejo de péptido de MHC clase II y/o un complejo de péptido de MHC-E. En algunas modalidades, una molécula de unión a péptidos, tal como un TCR o anticuerpo o CAR, que reconoce específica y/o selectivamente un péptido en el contexto de un MHC de clase I se puede usar para modificar células T CD8⁺. En algunas modalidades, también se proporciona una composición de células T CD8⁺ modificadas que expresan o contienen el TCR, anticuerpo o CAR, para el reconocimiento de un péptido presentado en el contexto de MHC clase I. En cualquiera de dichas modalidades, las células se pueden usar en los métodos de terapia celular adoptiva.

En algunas modalidades, las bibliotecas de TCR se pueden generar mediante amplificación del repertorio de V α y V β de células T aisladas de un sujeto, que incluyen células presentes en PBMC, bazo u otro órgano linfoide. En algunos casos, las células T se pueden amplificar a partir de linfocitos que infiltran el tumor (TIL). En algunas modalidades, las bibliotecas de TCR se pueden generar a partir de células CD4⁺ o CD8⁺. En algunas modalidades, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de células T de un sujeto sano normal, es decir, bibliotecas de TCR normales. En algunas modalidades, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de células T de un sujeto enfermo, es decir, bibliotecas de TCR enfermos. En algunas modalidades, se usan cebadores degenerativos para amplificar el repertorio de genes de V α y V β , tal como mediante RT-PCR en muestras, tales como células T, obtenidas de humanos. En algunas modalidades, se pueden ensamblar bibliotecas de scTv de bibliotecas de V α y V β sin tratamiento previo en las que los productos amplificados se clonan o ensamblan para que se separen mediante un enlazador. Dependiendo de la fuente del sujeto y las células, las bibliotecas pueden ser específicas de alelo HLA.

De manera alternativa, en algunas modalidades, se pueden generar bibliotecas de TCR mediante mutagenesis o diversificación de una molécula de TCR original o estructural. Por ejemplo, en algunos aspectos, un sujeto, por ejemplo, humano u otro mamífero tal como un roedor, puede vacunarse con un péptido, tal como un péptido identificado por los métodos de la presente. En algunas modalidades, se puede obtener una muestra del sujeto, tal como una

muestra que contiene linfocitos sanguíneos. En algunos casos, las moléculas de unión, por ejemplo, TCR, se pueden amplificar de una muestra, por ejemplo, células T contenidas en la muestra. En algunas modalidades, las células T específicas del antígeno se pueden seleccionar, tal como mediante análisis para evaluar la actividad de CTL contra el péptido. En algunos aspectos, los TCR, por ejemplo, presentes en las células T específicas del antígeno, se pueden seleccionar, tal como mediante actividad de unión, por ejemplo, afinidad o avidéz particular por el antígeno. En algunos aspectos, los TCR se someten a evolución dirigida, tal como mediante mutagenesis, por ejemplo, de la cadena α o β . En algunos aspectos, los residuos particulares dentro de las CDR del TCR están alterados. En algunas modalidades, los TCR seleccionados se pueden modificar mediante maduración por afinidad. En algunos aspectos, un TCR seleccionado se puede usar como un TCR de estructura original contra el antígeno.

En algunas modalidades, el sujeto es un humano, tal como un humano con un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En algunas modalidades, el sujeto es un roedor, tal como un ratón. En algunas de estas modalidades, el ratón es un ratón transgénico, tal como un ratón que expresa moléculas de MHC humano (es decir, HLA), tal como HLA-A2 (por ejemplo, Nicholson et ál. (2012) *Adv. Hematol.* 2012:404081).

En algunas modalidades, el sujeto es un ratón transgénico que expresa TCR humanos o es un ratón negativo al antígeno (por ejemplo, Li et ál. (2010) *Nat Med.* 16:1029-1034; Obenaus et ál. (2015) *Nat. Biotechnol.* 33:402-407). En algunas modalidades, el sujeto es un ratón transgénico que expresa moléculas de HLA humano y TCR humanos.

En algunas modalidades, tal como donde el sujeto es un ratón HLA transgénico, los TCR identificados se modifican, por ejemplo, para ser quiméricos o humanizados. En algunos aspectos, el andamiaje de TCR se modifica, tal como análogo a métodos de humanización de anticuerpos conocidos.

En algunas modalidades, dicha molécula estructural se usa para generar una biblioteca de TCR.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la biblioteca incluye TCR o partes de unión al antígeno de estos que se han modificado en comparación con la molécula de TCR original o estructural.

En algunas modalidades, los métodos de evolución dirigida se pueden usar para generar TCR con propiedades modificadas, tal como con mayor afinidad para un complejo de MHC-péptido

específico. En algunas modalidades, los enfoques de expresión implican modificación de un TCR de referencia original o conocido. Por ejemplo, en algunos casos, un TCR de tipo silvestre se puede usar como plantilla para producir TCR mutagenizados en los que uno o más residuos de las CDR mutan, y se seleccionan mutantes con una propiedad alterada deseada, tal como mayor afinidad por un antígeno diana deseado. En algunas modalidades, la evolución dirigida se logra mediante métodos de expresión que incluyen, de modo no taxativo, expresión de levaduras (Holler *et ál.* (2003) *Nat. Immunol.* 4:55-62; Holler *et ál.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:5387-5392), expresión de fagos (Li *et ál.* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:349-354), o expresión de células T (Chervin *et ál.* (2008) *J. Immunol. Methods* 339:175-184).

En algunas modalidades, las bibliotecas pueden ser solubles. En algunas modalidades, las bibliotecas son bibliotecas de expresión en las que los TCR se expresan en la superficie de un fago o célula, o unidos a una partícula o molécula, tal como una célula, ribosoma o ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN. Comúnmente, las bibliotecas de TCR, que incluyen bibliotecas de TCR normales y enfermos o bibliotecas diversificadas, se pueden generar en cualquier forma, incluso como un heterodímero o como una forma de cadena simple. En algunas modalidades, uno o más miembros del TCR pueden ser un heterodímero de cadena doble. En algunas modalidades, el emparejamiento de las cadenas $V\alpha$ y $V\beta$ puede fomentarse mediante la introducción de un enlace disulfuro. En algunas modalidades, los miembros de la biblioteca de TCR pueden ser una cadena simple de TCR (scTv o ScTCR), que, en algunos casos, puede incluir una cadena $V\alpha$ y $V\beta$ separada por un enlazador. Además, en algunos casos, luego del análisis y la selección de un TCR de la biblioteca, el miembro seleccionado se puede generar en cualquier forma, tal como un heterodímero de TCR de longitud completa o una forma de cadena simple o como fragmentos de unión al antígeno de estos.

Otros métodos para identificar moléculas que se unen a un péptido en el contexto de una molécula de MHC también se describen en la solicitud de patente estadounidense n.º 2020/0182884.

Más generalmente, la presente invención abarca ensayos para agentes de cribado, tal como proteínas de ensayo, que se unen a, o modulan la actividad de, MAGEA1 o un antígeno de esta. Dichos agentes incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos. En algunas modalidades, un método para identificar un agente que modula una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad

del agente candidato para modular la actividad de MAGEA1 y modular adicionalmente una respuesta inmunitaria de interés, tal como activación y/o actividad de células T citotóxicas moduladas, sensibilidad de células cancerosas a terapia de punto de control inmunitario, y similares.

- 5 En algunas modalidades, un ensayo es un ensayo libre de células o basado en células, que comprende poner en contacto una diana, con un agente de prueba, y determinar la capacidad del agente de prueba para modular (por ejemplo, regular positivamente o regular negativamente) la cantidad y/o actividad de la diana, tal como midiendo parámetros directos o indirectos como se describe a continuación.
- 10 En algunas modalidades, un ensayo es un ensayo basado en células, tal como uno que comprende poner en contacto (a) una célula de interés con un agente de prueba y determinar la capacidad del agente de prueba para modular la cantidad y/o actividad de la diana, tal como características de unión. Determinar la capacidad de los polipéptidos para unirse a, o interactuar entre sí se puede lograr, por ejemplo, midiendo la unión directa o midiendo un
- 15 parámetro de activación o función de células inmunitarias.
- En otra modalidad, un ensayo es un ensayo basado en células, que comprende poner en contacto una célula tal como una célula cancerosa con células inmunitarias (por ejemplo, células T citotóxicas) y un agente de prueba, y determinar la capacidad del agente de prueba para modular la cantidad y/o actividad de la diana, y/o respuestas inmunitarias moduladas, tal
- 20 como midiendo parámetros directos o indirectos como se describe a continuación.
- Los métodos descritos anteriormente y en la presente también se pueden adaptar para probar uno o más agentes que ya se sabe que modulan la cantidad y/o actividad de uno o más biomarcadores descritos en la presente para confirmar la modulación del uno o más biomarcadores y/o para confirmar los efectos de los agentes en lecturas de un fenotipo
- 25 deseado, tal como respuestas inmunitarias moduladas, sensibilidad al bloqueo del punto de control inmunitario y similares.
- En un ensayo de unión directa, una proteína del biomarcador (o sus respectivos polipéptidos o moléculas diana) se puede acoplar con un radioisótopo o etiqueta enzimática de modo que se puede determinar la unión al detectar la proteína o molécula etiquetada en un complejo. Por
- 30 ejemplo, las dianas se pueden etiquetar con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , ya sea directamente o indirectamente, y el radioisótopo se puede detectar mediante recuento directo de la

radioemisión o mediante recuento del centelleo. Alternativamente, las dianas se pueden etiquetar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la etiqueta enzimática se puede detectar mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto. La determinación de la interacción entre la diana y el sustrato también se puede lograr al usar ensayos con análisis de unión o enzimáticos estándares. En una o más modalidades de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser deseable inmovilizar polipéptidos o moléculas para facilitar la separación de formas en complejo de las que no formaron complejo de una o ambas de las proteínas o moléculas, así como permitir la automatización del ensayo.

La unión de un agente de prueba a una diana se puede lograr en cualquier recipiente adecuado para alojar los reactivos. Los ejemplos no limitantes de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. Las formas inmovilizadas de los anticuerpos comprendidos por la presente invención también pueden incluir anticuerpos unidos a una fase sólida como un material poroso, microporoso (con un diámetro promedio de poro menor que aproximadamente una micra) o macroporoso (con un diámetro promedio de poro de más de aproximadamente 10 micras), tal como una membrana, celulosa, nitrocelulosa o fibras de vidrio; un perla, tal como las hechas de agarosa o poliacrilamida o látex; o una superficie de un disco, placa o pocillo, tal como hecho de poliestireno.

Por ejemplo, en un ensayo de unión directo, los polipéptidos se pueden acoplar con un radioisótopo o etiqueta enzimática de manera que se puedan detectar las interacciones y/o actividad de los polipéptidos, tales como eventos de unión, mediante la detección de la proteína etiquetada en un complejo. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden etiquetar con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , ya sea directamente o indirectamente, y el radioisótopo se puede detectar mediante recuento directo de la radioemisión o mediante recuento del centelleo. Alternativamente, los polipéptidos se pueden etiquetar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la etiqueta enzimática se puede detectar mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

También está dentro del alcance de la presente invención determinar la capacidad de un agente para modular un parámetro de interés sin el marcaje de ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, se puede usar un microfisiómetro para detectar la interacción entre polipéptidos sin el marcaje de polipéptidos que se van a monitorizar (McConnell et ál. (1992) *Science*

257:1906-1912). Como se usa en la presente, un «microfisiómetro» (por ejemplo, Cytosensor®) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico direccionable por luz (LAPS). Los cambios en esta tasa de acidificación se pueden usar como un indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

En algunas modalidades, la determinación de la capacidad de un agente de prueba (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) para modular la interacción entre un conjunto dado de polipéptidos se puede lograr al determinar la actividad de uno o más miembros del conjunto de polipéptidos. Por ejemplo, la actividad de una proteína y/o una o más parejas de unión se puede determinar detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, señalización intracelular), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador sensible a la diana enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica para un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectando una respuesta celular regulada por la proteína y/o la una o más parejas de unión. La determinación de la capacidad del agente de prueba para unirse o interactuar con este polipéptido se puede lograr, por ejemplo, midiendo la capacidad de un compuesto para modular la coestimulación o inhibición de células inmunitarias en un ensayo de proliferación, o interfiriendo con la capacidad de este polipéptido para unirse a anticuerpos que reconocen una porción del mismo.

Los agentes que modulan la cantidad y/o actividad diana, tal como las interacciones con uno o más compañeros de unión, se pueden identificar por su capacidad para inhibir la proliferación de células inmunitarias, y/o la función efectora, o para inducir anergia, deleción clonal, y/o agotamiento cuando se añaden a un ensayo in vitro. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en presencia de un agente que estimula la transducción de señales a través de un receptor activador. Se pueden emplear varias lecturas reconocidas de activación celular para medir la proliferación celular o la función efectora (por ejemplo, producción de anticuerpos, producción de citocinas, fagocitosis) en presencia del agente. La capacidad de un agente de prueba para bloquear esta activación se puede determinar fácilmente midiendo la capacidad del agente para efectuar una disminución en la proliferación o la función efectora que se está midiendo, usando técnicas conocidas en la técnica.

Por ejemplo, los agentes abarcados por la presente invención se pueden ensayar para determinar la capacidad de inhibir o potenciar la coestimulación en un ensayo de células T, como se describe en Freeman et ál. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027 y Latchman et ál. (2001) *Nat. Immunol.* 2:261. Las células T CD4⁺ se pueden aislar de PBMC humanas y estimular con anticuerpo anti-CD3 activador. La proliferación de células T se puede medir mediante la incorporación de ³H timidina. Se puede realizar un ensayo con o sin coestimulación de CD28 en el ensayo. Se pueden realizar ensayos similares con células T Jurkat y blastos PHA de PBMC.

Alternativamente, los agentes abarcados por la presente invención se pueden ensayar para determinar la capacidad de modular la producción celular de citocinas que se producen por o cuya producción se potencia o inhibe en células inmunitarias en respuesta a la modulación del uno o más biomarcadores. Las citocinas indicativas liberadas por células inmunitarias de interés se pueden identificar por ELISA o por la capacidad de un anticuerpo que bloquea la citocina para inhibir la proliferación de células inmunitarias o la proliferación de otros tipos de células que es inducida por la citocina, tal como aquellas descritas en la sección de Ejemplos. Un ensayo de coestimulación de células inmunitarias in vitro también se puede usar en un método para identificar citocinas que se pueden modular mediante la modulación del uno o más biomarcadores. Por ejemplo, si una actividad particular inducida tras la coestimulación, por ejemplo, la proliferación de células inmunitarias, no puede inhibirse mediante la adición de anticuerpos de bloqueo a citocinas conocidas, la actividad puede resultar de la acción de una citocina desconocida. Después de la coestimulación, esta citocina se puede purificar a partir del medio por métodos convencionales y se puede medir su actividad por su capacidad para inducir la proliferación de células inmunitarias. Para identificar citoquinas que pueden desempeñar un papel en la inducción de tolerancia, se puede usar un ensayo de coestimulación de células T in vitro como se describió anteriormente. En este caso, a las células T se les daría la señal de activación primaria y se pondrían en contacto con una citocina seleccionada, pero no se les daría la señal coestimulante. Después de lavar y dejar en reposo las células inmunitarias, las células se volverían a desafiar con una señal de activación primaria y una señal coestimulante. Si las células inmunitarias no responden (por ejemplo, proliferan o producen citocinas), se han vuelto tolerantes y la citocina no ha evitado la inducción de tolerancia. Sin embargo, si las células inmunitarias responden, la inducción de tolerancia se

ha evitado por la citocina. Aquellas citocinas que son capaces de prevenir la inducción de tolerancia se pueden dirigir al bloqueo in vivo junto con reactivos que bloquean antígenos de linfocitos B como un medio más eficaz para inducir tolerancia en receptores de trasplante o sujetos con enfermedades autoinmunitarias.

- 5 En algunas modalidades, un ensayo abarcado por la presente invención es un ensayo libre de células para cribar agentes que modulan la interacción entre un biomarcador y/o uno o más compañeros de unión, que comprende poner en contacto un polipéptido y uno o más compañeros de unión naturales, o porción biológicamente activa del mismo, con un agente de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la interacción entre
- 10 el polipéptido y uno o más compañeros de unión naturales, o porción biológicamente activa del mismo. La unión del compuesto de prueba se puede determinar ya sea directa o indirectamente como se describió anteriormente. En una modalidad, el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido, o porción biológicamente activa del mismo, con su compañero de unión para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un
- 15 compuesto de ensayo y determinar la capacidad del agente de ensayo para interactuar con el polipéptido en la mezcla de ensayo, en donde determinar la capacidad del agente de ensayo para interactuar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del agente de ensayo para unirse preferentemente al polipéptido o porción biológicamente activa del mismo, en comparación con el compañero de unión.
- 20 En algunas modalidades, ya sea para ensayos basados en células o libres de células, un agente de prueba se puede analizar adicionalmente para determinar si afecta la unión y/o actividad de la interacción entre el polipéptido y el uno o más compañeros de unión, con otros compañeros de unión. Otros métodos de análisis de unión útiles incluyen el uso de Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real (Sjolander y Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.*
- 25 63:2338-2345 y Szabo *et ál.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Como se usa en la presente, «BIA» es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, Biacore®). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) se pueden usar como una indicación de reacciones en tiempo real entre polipéptidos biológicos. Los polipéptidos de interés se
- 30 pueden inmovilizar en un chip Biacore® y se pueden analizar múltiples agentes (anticuerpos bloqueantes, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) para determinar la unión al

polipéptido de interés. Un ejemplo de uso de la tecnología BIA se describe por Fitz et ál. (1997) *Oncogene* 15:613.

Los ensayos sin células abarcados por la presente invención son susceptibles de uso de formas de proteínas tanto solubles como unidas a membrana. En el caso de ensayos libres de células en los que se usa una proteína de forma unida a membrana, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de manera que la forma unida a membrana de la proteína se mantenga en solución. Ejemplos de estos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tal como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecipoli (etilenglicol éter)_n, 3-[(3-colamidopropil) dimetilminio]-1-propano sulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil) dimetilminio]-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO), o N-dodecil=N,N-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato.

En una o más modalidades de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser deseable inmovilizar cualquiera de los polipéptidos para facilitar la separación de las formas complejadas de las no complejadas de una o ambas de las proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de ensayo a un polipéptido, se puede lograr en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una modalidad, se puede proporcionar una proteína de fusión que agrega un dominio que permite que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de polipéptido basadas en glutatión-S-transferasa, o las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/diana, se pueden adsorber en cuentas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que luego se combinan con el compuesto de prueba, y la mezcla se incuba en condiciones propicias para la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para la sal y el pH). Luego de la incubación, las cuentas o las placas de microtitulación se lavan para eliminar los componentes sin unir, la matriz se inmoviliza en el caso de las cuentas, los complejos se determinan ya sea directa o indirectamente, por ejemplo, tal como se describe anteriormente. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz, y el nivel de unión o actividad del polipéptido se determina usando técnicas convencionales.

La presente invención se refiere además a nuevos agentes identificados mediante los ensayos

de cribado descritos anteriormente. Por consiguiente, está dentro del alcance de la presente invención usar adicionalmente un agente identificado como se describe en la presente en un sistema de modelo apropiado. Por ejemplo, un agente identificado como se describe en la presente se puede usar en un sistema modelo para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con este agente. Alternativamente, un agente identificado como se describe en la presente se puede usar en un sistema modelo para determinar el mecanismo de acción de este agente. Además, la presente invención se refiere a usos de agentes novedosos identificados por los ensayos de cribado descritos anteriormente para tratamientos como se describe en la presente.

10 d. Medicina predictiva

La presente invención también pertenece al campo de la medicina predictiva en la que se usan ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico y ensayos clínicos de monitorización con fines de pronóstico (predictivos) para así tratar profilácticamente a un individuo. Por consiguiente, un aspecto abarcado por la presente invención abarca ensayos de diagnóstico para determinar (por ejemplo, detectar) la presencia, ausencia, cantidad y/o nivel de actividad de MAGEA1 o reactividad a MAGEA1 en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, células o tejido) para determinar de ese modo si un individuo afectado con un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es probable que responda a la terapia, ya sea en un estado original o como una recurrencia. Estos ensayos se pueden usar con fines pronósticos o predictivos para tratar profilácticamente a un individuo antes del inicio o después de la recurrencia de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

Los métodos de diagnóstico descritos en la presente se pueden utilizar además para identificar sujetos que tienen o están en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con expresión o falta de expresión de MAGEA1. Como se usa en la presente, el término «aberrante» incluye un aumento de forma regulada o una disminución de forma regulada de MAGEA1 desde los niveles normales. La expresión o actividad aberrante incluye expresión o actividad aumentada o disminuida, así como expresión o actividad que no sigue el patrón de expresión de desarrollo normal o el patrón de expresión subcelular. Por ejemplo, se pretende que los niveles aberrantes incluyan los casos en los que una mutación en el gen biomarcador o la secuencia reguladora, o la amplificación del gen cromosómico, del mismo provoca el aumento de forma regulada o la disminución de forma regulada del biomarcador de interés. Como se usa en la

presente, el término «no deseado» incluye un fenómeno no deseado involucrado en una respuesta biológica, tal como la actividad de células inmunitarias.

Los ensayos descritos en la presente, tal como los ensayos de diagnóstico anteriores o los siguientes ensayos, se pueden utilizar para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la mala regulación de MAGEA1. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para identificar un trastorno asociado con la regulación de MAGEA1 aberrante o no deseada en la que se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto y se detecta la expresión de MAGEA1, en donde la presencia de la expresión de MAGEA1 es diagnóstica para un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar el trastorno asociado con la expresión de MAGEA1 aberrante o no deseada. Como se usa en la presente, una «muestra de prueba» se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de prueba puede ser un fluido biológico (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo o suero), muestra celular o tejido, tal como un portaobjetos histopatológico del microambiente tumoral, área peritumoral y/o área intratumoral.

Además, los ensayos de pronóstico descritos en la presente se pueden usar para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente descrito en la presente para tratar este trastorno asociado con la expresión de MAGEA1 aberrante o no deseada. Por ejemplo, estos métodos se pueden usar para determinar si un sujeto se puede tratar eficazmente con uno o una combinación de agentes. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para determinar si un sujeto se puede tratar eficazmente con uno o más agentes descritos en la presente para tratar un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1 aberrante o no deseada.

Los métodos descritos en la presente se pueden realizar, por ejemplo, al utilizar kits de diagnóstico preempaquetados que comprenden al menos un reactivo de anticuerpo descrito en la presente, que se puede usar convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos para diagnosticar pacientes que presentan síntomas o antecedentes familiares de una enfermedad o enfermedad que involucra el biomarcador de interés.

Además, cualquier tipo de célula o tejido en el que se expresa el biomarcador de interés se puede utilizar en los ensayos de pronóstico descritos en la presente.

e. Monitoreo de los efectos durante ensayos clínicos

El monitoreo de la influencia de un trastorno caracterizado por la terapia de expresión de MAGEA1 (por ejemplo, compuestos, fármacos, vacunas, terapias celulares y similares) en respuestas inmunitarias, tal como reactividad de células T (por ejemplo, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora), se puede aplicar no solo en el cribado de moléculas de unión a antígeno MAGEA1 candidatas básicas, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de los péptidos inmunogénicos, pMHC, células modificadas, proteínas de unión y composiciones relacionadas descritas en la presente para aumentar la respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta inmunitaria de células T) contra células de interés, tal como células hiperproliferativas, que expresan MAGEA1, se puede monitorear en ensayos clínicos de sujetos que padecen un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En estos ensayos clínicos, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora (por ejemplo, proliferación de células T, aniquilación y/o liberación de citocinas), se puede usar como una «lectura» o marcador del fenotipo de una célula, tejido o sistema particular. De manera similar, la eficacia de una terapia de células T adaptativa con células T modificadas para expresar una proteína de unión (por ejemplo, un TCR, un fragmento de unión al antígeno de un TCR, un CAR o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector) como se describe en la presente para aumentar la respuesta inmunitaria a células de interés, tales como células hiperproliferativas, que expresan MAGEA1, se puede controlar en ensayos clínicos de sujetos que tienen un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En estos ensayos clínicos, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora (por ejemplo, proliferación de células T, aniquilación o liberación de citocinas), se puede usar como una «lectura» o marcador del fenotipo de una célula, tejido o sistema particular.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para controlar la eficacia del tratamiento de una terapia (por ejemplo, compuestos, fármacos, vacunas, terapias celulares y similares) que incluyen las etapas de a) determinar la ausencia, presencia o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y una o más proteínas de unión o una composición relacionada, en una primera muestra obtenida del sujeto antes de proporcionar al menos una parte de la terapia para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 al sujeto, y b) determinar la ausencia, presencia o el nivel de reactividad entre una o más proteínas de unión o una composición relacionada y una muestra obtenida del sujeto presente en una segunda muestra obtenida del sujeto después de proporcionar parte de la terapia,

donde la presencia o un nivel mayor de reactividad en la primera muestra, con respecto a la segunda muestra, es una indicación de que la terapia es eficaz para el tratamiento del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto y donde la ausencia o un nivel más bajo de reactividad en la primera muestra, con respecto a la segunda muestra, es una indicación de que la terapia no es eficaz para el tratamiento del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para monitorear la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (*p. ej.*, anticuerpos, un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato identificado mediante ensayos de cribado descritos en la presente) incluidas las etapas de (i) obtener una muestra preadministración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar la expresión de MAGEA1 en la muestra preadministración; (iii) obtener una o más muestras posadministración del sujeto; (iv) detectar la expresión de MAGEA1 en las muestras posadministración; (v) comparar la expresión de MAGEA1 en la muestra preadministración con la expresión de MAGEA1 en la muestra posadministración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto, en consecuencia. El análisis de polipéptidos biomarcadores, tal como mediante inmunohistoquímica (IHC), también se puede usar para seleccionar a pacientes que recibirán terapia, tal como inmunoterapia.

Además, los métodos de pronóstico descritos en la presente se pueden usar para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente terapéutico para tratar un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1.

f. Eficacia clínica

La eficacia clínica se puede medir por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la respuesta a una terapia se refiere a cualquier respuesta del trastorno asociado con la expresión de MAGEA1, por ejemplo, un tumor, a la terapia, preferiblemente a un cambio en el número de células cancerosas, masa tumoral y/o volumen tumoral, tal como después del inicio de la quimioterapia neoadyuvante o adyuvante. La respuesta tumoral se puede evaluar en una situación neoadyuvante o adyuvante en la que el tamaño de un tumor después de la intervención sistémica se puede comparar con el tamaño y las dimensiones iniciales medidos mediante TC, PET, mamografía, ultrasonido o palpación y la celularidad de un tumor se puede

estimar histológicamente y comparar con la celularidad de una biopsia tumoral tomada antes del inicio del tratamiento. La respuesta también se puede evaluar mediante medición con compás calibrador o examen patológico del tumor después de la biopsia o resección quirúrgica. La respuesta se puede registrar de una manera cuantitativa tal como el cambio porcentual en el volumen tumoral o la celularidad o mediante el uso de un sistema de puntuación semicuantitativo tal como la carga de cáncer residual (Symmans et ál. (2007) *J. Clin. Oncol.* 25:4414-4422) o Miller-Payne score (Ogston et ál. (2003) *Breast (Edinburgh, Scotland)* 12:320-327) de una manera cualitativa como «respuesta patológica completa» (pCR), «remisión clínica completa» (cCR), «remisión clínica parcial» (cPR), «enfermedad clínica estable» (cSD), «enfermedad clínica progresiva» (cPD) u otros criterios cualitativos. La evaluación de la respuesta tumoral se puede realizar temprano después del inicio de la terapia neoadyuvante o adyuvante (por ejemplo, después de unas pocas horas, días, semanas o preferiblemente después de unos pocos meses). Un criterio de valoración habitual para la evaluación de la respuesta es tras la terminación de la quimioterapia neoadyuvante o tras la remoción quirúrgica de células tumorales residuales y/o el lecho tumoral.

En algunas modalidades, la eficacia clínica de los tratamientos terapéuticos descritos en la presente se puede determinar al medir la tasa de beneficio clínico (CBR, por sus siglas en inglés). La tasa de beneficio clínico se mide al determinar la suma del porcentaje de pacientes que están en remisión completa (CR, por sus siglas en inglés), el número de pacientes que están en remisión parcial (PR, por sus siglas en inglés) y el número de pacientes que tienen enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés) en un punto de tiempo al menos 6 meses después del fin de la terapia. La descripción abreviada para esta fórmula es $CBR = CR + PR + SD$ a los 6 meses. En algunas modalidades, la CBR para un régimen terapéutico modulador particular de biomarcadores indicados en la Tabla 1 es al menos 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o más.

Los criterios adicionales para evaluar la respuesta a terapias para el cáncer se relacionan con la «supervivencia», que incluye todo lo siguiente: supervivencia hasta mortalidad, también conocida como la supervivencia global (en donde dicha mortalidad puede ser independientemente de la causa o relacionada con el tumor); «supervivencia libre de recurrencia» (en donde el término recurrencia incluirá recurrencia localizada y distante); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (en donde el término

incluirá cáncer y enfermedades asociadas a este). La duración de esta supervivencia se puede calcular por referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, tiempo de diagnóstico o inicio de tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para incluir la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un período de tiempo dado y la probabilidad de recurrencia del tumor.

Por ejemplo, para determinar los valores umbral adecuados, se puede administrar un agente particular de interés a una población de sujetos y el resultado se puede correlacionar con las mediciones del biomarcador que se determinaron antes de la administración de cualquier terapia. La medición del resultado puede ser una respuesta patológica a la terapia dada en el entorno neoadyuvante. Alternativamente, las mediciones del resultado, tales como supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad se pueden monitorear durante un período de tiempo para sujetos después de la terapia para los cuales se conocen los valores de la expresión de MAGEA1. En determinadas modalidades, se administran las mismas dosis del agente a cada sujeto. El período de tiempo en el que se monitorea a los sujetos puede variar. Por ejemplo, los sujetos se pueden monitorear durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 meses o más. Los valores umbral de medición de MAGEA1 que se correlacionan con el resultado de una terapia se pueden determinar usando métodos bien conocidos, tal como aquellos descritos en la sección de Ejemplos.

X.Terapia celular

En otro aspecto abarcado por la presente invención, los métodos incluyen terapia celular adoptiva, mediante la cual se administran células modificadas genéticamente que expresan las moléculas proporcionadas que se dirigen a un epítipo restringido a MHC (por ejemplo, células que expresan una proteína de unión (por ejemplo, un TCR o CAR) o fragmento de unión al antígeno de este) a sujetos. Esta administración puede promover la activación de células inmunitarias (por ejemplo, activación de células T) de una manera dirigida a antígeno, de modo que las células de interés, tal como células hiperproliferativas, que expresan MAGEA1 se dirigen a la destrucción.

Por lo tanto, los métodos y usos proporcionados incluyen métodos y usos para terapia celular

adoptiva. En algunas modalidades, los métodos incluyen la administración de las células o una composición que contiene las células a un sujeto, tejido o célula, tal como uno que tiene, está en riesgo o se sospecha que tiene la enfermedad, afección o trastorno. En algunas modalidades, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto que tiene la enfermedad o condición particular que se va a tratar (por ejemplo, mediante terapia celular adoptiva, tal como mediante terapia celular T adoptiva). En algunas modalidades, las células o composiciones se administran al sujeto, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de la enfermedad o afección. En algunas modalidades, los métodos por lo tanto tratan, por ejemplo, mejoran uno o más síntomas de la enfermedad o afección.

10 Se conocen y se pueden utilizar métodos para la administración de células para terapia celular adoptiva con relación a los métodos y composiciones proporcionados (por ejemplo, publicación de patente estadounidense n.º 2003/0170238, patente estadounidense n.º 4,690,915, Rosenberg (2011) *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8:577-585, Themeli et ál. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:928-933, Tsukahara et ál. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438:84-89, y Davila et ál. (2013) *PLoS ONE* 8:e61338).

15 En algunas modalidades, la terapia celular (por ejemplo, terapia celular adoptiva, tal como terapia de células T adoptiva) se puede llevar a cabo por transferencia autóloga, en la cual las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir del sujeto que va a recibir la terapia celular, o a partir de una muestra derivada de este sujeto. Por lo tanto, en algunas modalidades, las células se derivan de un sujeto (por ejemplo, paciente) en necesidad de un tratamiento y las células, después del aislamiento y procesamiento se administran al mismo sujeto.

20 En algunas modalidades, la terapia celular (por ejemplo, terapia celular adoptiva, tal como terapia celular T adoptiva) se puede llevar a cabo por transferencia alogénica, en la cual las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir de un sujeto distinto de un sujeto que va a recibir o que recibe por último la terapia celular (por ejemplo, un primer sujeto). En estas modalidades, las células entonces se administran a un sujeto diferente (por ejemplo, un segundo sujeto) de la misma especie. En algunas modalidades, el primer y segundo sujetos son genéticamente idénticos (singénicos). En algunas modalidades, el primer y segundo sujetos son genéticamente similares. En algunas modalidades, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo de HLA que el primer sujeto.

En algunas modalidades, el sujeto al que se administran las células, poblaciones de células o composiciones es un primate, tal como un humano. En algunas modalidades, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser masculino o femenino y puede ser de cualquier edad adecuada, incluyendo sujetos infantiles, juveniles, adolescentes, adultos, y geriátricos. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero no primate, tal como un roedor. En algunos ejemplos, el paciente o sujeto es un modelo animal validado para enfermedad, terapia celular adoptiva y/o para evaluar resultados tóxicos tal como síndrome de liberación de citocinas (CRS).

Las moléculas de unión, tal como TCR, fragmentos de unión a antígeno de TCR (por ejemplo, scTCR) y receptores quiméricos (por ejemplo, CAR) que contienen el TCR, y células que expresan el mismo, se pueden administrar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidal, inyección intracameral, inyección subconjuntiva, inyección subconjuntival, inyección sub-Tenon, inyección retrobar, inyección peribulbar o administración yuxtapalpebral posterior. En algunas modalidades, se administran por administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación y administración pueden depender en parte de si la administración es breve o crónica. Varios programas de dosificación incluyen, pero no se limitan a administraciones individuales o múltiples durante varios puntos de tiempo, administración en bolo, e infusión de impulso.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de la molécula o célula de unión puede depender del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de molécula de unión, la gravedad y curso de la enfermedad, si la molécula de unión se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la molécula de unión, y la discreción del facultativo tratante. Las composiciones y moléculas y células en algunas modalidades se administran de manera adecuada al paciente en un momento o durante una serie de tratamientos.

En algunas modalidades, las células se pueden administrar a $0,1 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $0,6 \times 10^6$, $0,7 \times 10^6$, $0,8 \times 10^6$, $0,9 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $5,0$

$\times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $5,0 \times 10^8$, o más, o cualquier intervalo entre ellos o cualquier valor entre ellos, células por kilogramo de peso corporal del sujeto. La cantidad de células trasplantadas se puede ajustar en función del nivel deseado de injerto en una cantidad de tiempo deseada. Generalmente, se pueden trasplantar 1×10^5 a aproximadamente 1×10^9 células/kg de peso corporal, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^8 células/kg de peso corporal, o aproximadamente 1×10^7 células/kg de peso corporal o más células, según sea necesario. En alguna modalidad, el trasplante de al menos aproximadamente $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$ o $5,0 \times 10^6$ células totales con respecto a un ratón de tamaño promedio es eficaz. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células, o poblaciones individuales de subtipos de células, se pueden administrar al sujeto en un intervalo de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, por ejemplo, de 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1 mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), tal como aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células, aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), y en algunos casos aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o

cualquier valor entre estos intervalos y/o por kilogramo de peso corporal. Las dosificaciones pueden variar dependiendo de los atributos particulares para la enfermedad o trastorno y/o paciente y/u otros tratamientos.

El injerto de células trasplantadas se puede evaluar mediante cualquiera de varios métodos, tales como, pero sin limitarse a, volumen tumoral, niveles de citocina, tiempo de administración, análisis por citometría de flujo de células de interés obtenidas del sujeto en uno o más puntos de tiempo después del trasplante y similares. Por ejemplo, un análisis basado en el tiempo de espera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 días o puede señalar el tiempo para la recolección del tumor. Cualesquiera de estas métricas son variables que se pueden ajustar de acuerdo con parámetros bien conocidos para determinar el efecto de la variable en una respuesta a inmunoterapia anticancerosa. Además, las células trasplantadas se pueden cotrasplantar con otros agentes, tal como citocinas, matrices extracelulares, soportes de cultivo celular y similares.

Las células también se pueden administrar antes, al mismo tiempo con o después de otros agentes anticancerosos.

Se pueden combinar y administrar dos o más tipos de células, tal como terapia basada en células y transferencia celular adoptiva de células madre, vacunas contra el cáncer y terapia basada en células, y similares. Por ejemplo, las inmunoterapias basadas en células adoptivas se pueden combinar con las terapias basadas en células abarcadas por la presente invención. En algunas modalidades, los agentes basados en células se pueden usar solos o en combinación con agentes basados en células adicionales, tal como inmunoterapias como terapia de células T adoptiva (ACT). Por ejemplo, las células T genéticamente modificadas para reconocer CD19 utilizado para tratar el linfoma folicular de células B. Las células inmunitarias para ACT pueden ser células dendríticas, células T tal como células T CD8⁺ y células T CD4⁺, células aniquiladoras naturales (NK), células T NK, linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), células aniquiladoras activadas por linfocinas (LAK), células T de memoria, células T reguladoras (Treg), células T auxiliares, células aniquiladoras inducidas por citocinas (CIK) y cualquier combinación de las mismas. Modalidades inmunoterapéuticas basadas en células adoptivas bien conocidas, que incluyen, sin limitación, células tumorales autólogas o alogénicas irradiadas, lisados tumorales o células tumorales apoptóticas, inmunoterapia basada en células presentadoras de antígenos, inmunoterapia

basada en células dendríticas, transferencia de células T adoptiva, terapia de células T CAR adoptiva, terapia de mejora inmune autóloga (AIET), vacunas contra el cáncer y/o células presentadoras de antígenos. Estas inmunoterapias basadas en células se pueden modificar

5 respuestas inmunitarias, tal como expresar citocinas como GM-CSF, y/o para expresar antígenos de antígeno asociado a tumor (TAA), tal como Mage-1, gp-100 y similares. La relación de un agente abarcado por la presente invención, tal como células cancerosas, a otro agente abarcado por la presente invención u otra composición puede ser de 1:1 entre sí (por ejemplo, cantidades iguales de 2 agentes, 3 agentes, 4 agentes, etc.), pero puede modularse
10 en cualquier cantidad deseada (por ejemplo, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1, 6,5:1, 7:1, 7,5:1, 8:1, 8,5:1, 9:1, 9,5:1, 10:1, o mayor).

En algunas modalidades, por ejemplo, donde el sujeto es un humano, la dosis incluye menos de aproximadamente 1×10^8 células que expresan proteína de unión total (por ejemplo, TCR o CAR), células T o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), por ejemplo, en el
15 intervalo de aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 de estas células, tal como 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 o 1×10^8 o el total de estas células, o el intervalo entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, las células o composiciones relacionadas descritas en la presente, tal como ácidos nucleicos, células hospedadoras, formulaciones farmacéuticas y similares, se pueden administrar como parte de un tratamiento de combinación, tal como simultáneamente
20 con, o de manera secuencial con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, tal como otro anticuerpo o célula modificada o receptor o agente, tal como un agente terapéutico o citotóxico.

En algunas modalidades, las células o composición relacionada se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos adicionales o con relación a otra intervención terapéutica, ya sea de manera simultánea o secuencialmente en cualquier orden. En algunos contextos, las
25 células o la composición relacionada se coadministran con otra terapia suficientemente cercana en el tiempo tal que las poblaciones de células mejoren el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunas modalidades, las células o la composición relacionada se administran antes del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas
30 modalidades, las células o la composición relacionada se administran después del uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En algunas modalidades, la actividad biológica de las células o composición relacionada se mide por cualquiera de varios métodos conocidos una vez que las células o composición relacionada se administran a un sujeto (por ejemplo, un humano). Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T modificada o natural u otra célula inmunitaria al antígeno, in vivo, por ejemplo, por formación de imágenes, o in vitro/ex vivo, por ejemplo, por ELISA o citometría de flujo. En algunas modalidades, la capacidad de las células para destruir las células diana (citotoxicidad) se puede medir utilizando cualquier ensayo o método adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, Kochenderfer et ál. (2009) *J. Immunother.* 32: 689-702 y Herman et ál. (2004) *J. Immunol. Meth.* 285:25-40). En algunas modalidades, la actividad biológica de las células también se puede medir al evaluar la expresión y/o secreción de ciertas citocinas, tal como CD107a, IFN γ , IL-2, y TNF alfa. En algunas modalidades, la actividad biológica se mide al evaluar el resultado clínico, tal como la reducción en la carga o carga viral.

En algunas modalidades, las células se modifican de varias maneras, tal que se incremente su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, la proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o fragmento de unión a antígeno del mismo) expresada por la población se puede conjugar ya sea directa o indirectamente a través de un ligador a una porción de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos para porciones de direccionamiento es bien conocida en la técnica (por ejemplo, Wadwa et ál. (1995) *J. Drug Targeting* 3:111 y patente estadounidense n.º 5087616).

Las células inmunitarias, tal como linfocitos citotóxicos, se pueden obtener de cualquier fuente adecuada tal como sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos. Las células inmunitarias se pueden usar como preparaciones crudas o como preparaciones parcialmente purificadas o sustancialmente purificadas, que se pueden obtener mediante técnicas convencionales, incluyendo, pero no limitado a, métodos que implican técnicas inmunomagnéticas o de citometría de flujo usando anticuerpos.

En determinados aspectos, los péptidos inmunogénicos de MAGEA1 descritos en la presente, o un ácido nucleico que codifica dichos péptidos inmunogénicos de MAGEA1, se pueden usar en composiciones y métodos para proporcionar células presentadoras de antígeno, cebadas con MAGEA1 y/o linfocitos específicos de MAGEA1 generados con estas células presentadoras de antígeno. En algunas modalidades, dichas células presentadoras de

antígeno y/o linfocitos se usan en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1.

En algunos aspectos, en la presente se proporcionan métodos para producir células presentadoras de antígeno cebadas con MAGEA1 al poner en contacto las células presentadoras de antígeno con un péptido inmunogénico de MAGEA1 descrito en la presente o ácidos nucleicos que codifican al menos un péptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante, *in vitro* en condiciones suficientes para que al menos un polipéptido inmunogénico de MAGEA1 sea presentado por las células presentadoras de antígeno.

10 En algunas modalidades, el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante, puede ponerse en contacto con una composición homogénea, sustancialmente homogénea o heterogénea que comprende células presentadoras de antígeno. Por ejemplo, la composición puede incluir, de modo no taxativo, sangre entera, sangre fresca, o partes de esta, tales como, 15 de modo no taxativo, células mononucleares de sangre periférica, fracciones de capa leucocitaria de sangre entera, glóbulos rojos empaquetados, sangre irradiada, células dendríticas, monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citolíticos naturales. Si, opcionalmente, se usan precursores de las células presentadoras de antígeno, los precursores se pueden cultivar en condiciones de cultivo 20 adecuadas suficientes para diferenciar los precursores en células presentadoras de antígeno. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno (o precursores de estas) se seleccionan de monocitos, macrófagos, células de linaje mieloide, células B, células dendríticas o células de Langerhans.

La cantidad del polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante, que se colocará 25 en contacto con las células presentadoras de antígeno la puede determinar un experto en la técnica mediante experimentación de rutina. En general, las células presentadoras de antígeno entran en contacto con el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o un ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante, 30 durante un período de tiempo suficiente para que las células presenten las formas procesadas de los antígenos para la modulación de las células T. En una modalidad, las células

presentadoras de antígeno se incuban en presencia del polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante, durante menos de alrededor de una semana, de manera ilustrativa, durante alrededor de 1 minuto a alrededor de 48 horas, alrededor de 2 minutos a
5 alrededor de 36 horas, alrededor de 3 minutos a alrededor de 24 horas, alrededor de 4 minutos a alrededor de 12 horas, alrededor de 6 minutos a alrededor de 8 horas, alrededor de 8 minutos a alrededor de 6 horas, alrededor de 10 minutos a alrededor de 5 horas, alrededor de 15 minutos a alrededor de 4 horas, alrededor de 20 minutos a alrededor de 3 horas, alrededor de 30 minutos a alrededor de 2 horas y alrededor de 40 minutos a alrededor de 1 hora. El tiempo
10 y la cantidad del polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante, necesario para que las células presentadoras de antígeno procesen y presenten los antígenos se pueden determinar, por ejemplo, usando métodos de pulso y caza, donde al contacto le sigue un período de reposo y exposición a un sistema de lectura, por ejemplo, células T reactivas a
15 antígeno.

En determinadas modalidades, se puede usar cualquier método adecuado para suministrar antígenos a la vía de procesamiento endógena de las células presentadoras de antígeno. Dichos métodos incluyen, de modo no taxativo, métodos que implican liposomas sensibles al pH, acoplamiento de antígenos con adyuvantes, suministro de células apoptóticas, pulsado de
20 células sobre células dendríticas, suministro de partículas tipo virus (VLP) quiméricas recombinantes que comprenden antígeno a la vía de procesamiento de MHC clase I de una línea de células dendríticas.

En una modalidad, el polipéptido inmunogénico de MAGEA1 solubilizado se incuba con células presentadoras de antígeno. En algunas modalidades, el polipéptido inmunogénico de
25 MAGEA1 se puede acoplar con una citolisina para potenciar la transferencia de los antígenos hacia el citosol de una célula presentadora de antígeno para el suministro a la vía MHC clase I. Ejemplos de citolisinas incluyen compuestos de saponina tales como complejos estimuladores del sistema inmunitario (ISCOM5) que contienen saponina, toxinas que forman poros (por ejemplo, una alfa toxina) y citolisinas naturales de bacterias gram positivas tales
30 como listeriolisina O (LLO), estreptolisina O (SLO) y perfringolisina O (PFO).

En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno, tales como las células

dendríticas y los macrófagos, se pueden aislar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica y transfectarse con polinucleótidos mediante los métodos conocidos en la técnica para la introducción de un ácido nucleico que codifica el polinucleótido inmunogénico de MAGEA1 en la célula presentadora de antígeno. Los reactivos y métodos de transfección son conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles. Por ejemplo, el ARN que codifica polipéptido inmunogénico de MAGEA1 puede proporcionarse en un medio adecuado y combinarse con un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico) antes de ponerse en contacto con las células presentadoras de antígeno. Ejemplos no taxativos de dichos lípidos incluyen LIPOFECTIN™ y LIPOFECTAMINE™. El complejo de polinucleótido-lípido resultante luego puede ponerse en contacto con las células presentadoras de antígeno. De manera alternativa, el polinucleótido se puede introducir en células presentadoras de antígeno usando técnicas tales como electroporación o transfección con fosfato de calcio. Las células presentadoras de antígeno cargadas con polinucleótido luego se pueden usar para estimular la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocito T citotóxico) *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En una modalidad, el linfocito T ampliado *ex vivo* se administra a un sujeto en un método de inmunoterapia adoptiva.

En determinados aspectos, en la presente se proporciona una composición que comprende células presentadoras de antígeno que se pusieron en contacto *in vitro* con un polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante en una condición suficiente para que las células presentadoras de antígeno presenten un epítipo inmunogénico de MAGEA1.

En algunos aspectos, en la presente se proporciona un método para preparar linfocitos específicos para una proteína MAGEA1. El método comprende poner en contacto los linfocitos con las células presentadoras de antígeno descritas anteriormente en condiciones suficientes para producir un linfocito específico de proteína MAGEA1 capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra una célula infectada por el virus MAGEA1. Por lo tanto, las células presentadoras de antígeno también se pueden usar para proporcionar linfocitos, que incluyen linfocitos T y linfocitos B, para provocar una respuesta inmunitaria contra una célula infectada por el virus MAGEA1.

En algunas modalidades, una preparación de linfocitos T se pone en contacto con las células presentadoras de antígeno descritas anteriormente durante un período de tiempo (por ejemplo, al menos alrededor de 24 horas) para cebar los linfocitos T a un epítipo inmunogénico

MAGEA1 presentado por las células presentadoras de antígeno.

En algunas modalidades, una población de células presentadoras de antígeno puede cultivarse conjuntamente con una población heterogénea de linfocitos T de sangre periférica junto con un polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o combinado con un adyuvante. Las células pueden cultivarse conjuntamente durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que los epítomos de MAGEA1 incluidos en los polipéptidos de MAGEA1 sean presentados por las células presentadoras de antígeno y las células presentadoras de antígeno ceban una población de linfocitos T para que respondan a las células infectadas por el virus MAGEA1. En determinadas modalidades, en la presente se proporcionan linfocitos T y linfocitos B cebados para que respondan a las células infectadas por el virus MAGEA1.

Los linfocitos T se pueden obtener de cualquier fuente adecuada tal como sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos. Los linfocitos T se pueden usar como preparaciones crudas o como preparaciones parcialmente purificadas o sustancialmente purificadas, que se pueden obtener mediante técnicas convencionales, incluyendo, de modo no taxativo, métodos que implican técnicas inmunomagnéticas o de citometría de flujo usando anticuerpos.

En determinados aspectos, en la presente se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende las células presentadoras de antígeno o los linfocitos descritos anteriormente, y un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, la composición comprende además un adyuvante como se describió anteriormente.

En determinados aspectos y como se describió adicionalmente anteriormente, en la presente se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria a la célula infectada por el virus MAGEA1, donde el método comprende administrarle al sujeto las células presentadoras de antígeno o los linfocitos descritos anteriormente en cantidades eficaces suficientes para provocar la respuesta inmunitaria. En algunas modalidades, en la presente se proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, donde el método comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de las células presentadoras de antígeno o los linfocitos descritos anteriormente. En una modalidad, las células presentadoras de antígeno o los linfocitos se administran sistémicamente, preferentemente mediante inyección. De manera alternativa, la administración puede ser local

en vez de sistémica, por ejemplo, mediante inyección directamente en el tejido, preferentemente en un depósito o formulación de liberación sostenida.

En determinadas modalidades, las células presentadoras de antígeno cebadas con antígeno descritas en la presente y los linfocitos T específicos del antígeno generados con estas células presentadoras de antígeno se pueden usar como compuestos activos en composiciones inmunomoduladoras para tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno cebadas con MAGEA1 descritas en la presente se pueden usar para generar linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos B para transferencia adoptiva al sujeto. Por lo tanto, por ejemplo, el linfocito específico de MAGEA1 se puede transferir de manera adoptiva con fines terapéuticos en sujetos que padecen un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En determinadas modalidades, las células presentadoras de antígeno y/o los linfocitos descritos en la presente se pueden administrar a un sujeto, ya sea por sí solos o combinados, para provocar una respuesta inmunitaria, particularmente para provocar una respuesta inmunitaria a las células que expresan MAGEA1. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno y/o los linfocitos pueden derivar del sujeto (es decir, células autólogas) o de un sujeto diferente con correspondencia o no correspondencia de MHC con el sujeto (por ejemplo, alogénico).

Las administraciones simples o múltiples de las células presentadoras de antígeno y linfocitos se pueden llevar a cabo con cantidades de células y tratamiento seleccionados por el prestador de salud (por ejemplo, médico). En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno y/o los linfocitos se administran en un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores adecuados pueden ser un medio adecuado en el cual crecen las células, o cualquier medio amortiguador adecuado, tal como solución salina amortiguada con fosfato. Las células se pueden administrar solas o como una terapia adyuvante junto con otros agentes terapéuticos.

En otro aspecto abarcado por la presente invención, se proporciona un método para provocar una respuesta inmunitaria a una célula que expresa MAGEA1, donde el método comprende administrarle al sujeto las células descritas en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR, o fragmento de unión a antígeno del mismo) en cantidades eficaces suficientes para provocar la respuesta inmunitaria. En algunas

modalidades, en la presente se proporciona un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de las células descritas en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o un fragmento de unión a antígeno del mismo).

- 5 En una modalidad, las células se administran sistémicamente, tal como mediante inyección. Alternativamente, se puede administrar localmente en lugar de sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección directamente en el tejido, tal como en un depósito o formulación de liberación sostenida.

- En algunas modalidades, las células descritas en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o fragmento de unión a antígeno del mismo) se pueden usar como compuestos activos en composiciones inmunomoduladoras para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En algunas modalidades, las células presentadoras de antígeno cebadas con MAGEA1 se pueden usar para generar linfocitos (por ejemplo, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T
- 10 CD4⁺ y/o linfocitos B), para su uso adicional en la transferencia adoptiva al sujeto con las células descritas en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o fragmento de unión a antígeno de los mismos).

- En algunas modalidades, las células descritas en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o fragmento de unión a antígeno del mismo), ya sea solo o en combinación con los linfocitos, se pueden administrar a un sujeto para provocar una
- 15 respuesta inmunitaria, particularmente para provocar una respuesta inmunitaria a células que expresan MAGEA1.

- Como se describió anteriormente, las administraciones individuales o múltiples de las células descritas en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o fragmento de unión al antígeno del mismo), ya sea solo o en combinación con los linfocitos, se pueden llevar a cabo con números de células y el tratamiento seleccionado por el proveedor de atención (por ejemplo, médico). De manera similar, las células, ya sea solas o en combinación con linfocitos, se pueden administrar en un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores adecuados pueden ser medio de crecimiento en el que se cultivaron
- 20 las células, o cualquier medio de amortiguamiento adecuado tal como solución salina amortiguada con fosfato. Las células se pueden administrar solas o como una terapia

complementaria junto con otros agentes terapéuticos.

XI. Kits y dispositivos

La presente invención también abarca kits y dispositivos. Por ejemplo, el kit o dispositivo puede comprender proteínas de unión, ácidos nucleicos o vectores que comprenden secuencias que codifican para proteínas de unión, células hospedadoras que comprenden ácidos nucleicos o vectores y/o que expresan las proteínas de unión como se describe en la presente, complejos estables de MHC-péptido, adyuvantes, reactivos de detección y combinaciones de los mismos, empaquetados en un contenedor adecuado y pueden comprender además instrucciones para usar estos reactivos. El kit también puede contener otros componentes, tal como herramientas de administración empaquetadas en un contenedor separado. El kit se puede promover, distribuir o vender como una unidad para realizar los métodos abarcados por la presente invención.

La descripción se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos para el Ejemplo 2

a. Identificación de epítomos inmunogénicos

(i) Descubrimiento y diseño de conjunto de TCR

Se obtuvieron secuencias TCR de un paciente con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) que respondió al bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario (por ejemplo, presentó una reducción del 60 % en el tamaño tumoral luego de la terapia con anti-PD1 y anti-CTLA4). Se clonaron secuencias TCR alfa y TCR beta emparejadas individuales, previamente obtenidas mediante secuenciación de células individuales (10X Genomics) de biopsias de tumor disociadas, en una única construcción que expresa regiones TRBC y TRAC de ratón para crear TCR humanos-de ratón separados por un P2A. Las construcciones de TCR se empaquetaron con células Lenti-X™ (Takara Bio USA, Mountain View, CA). En resumen, las construcciones de TCR se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® (Polyplus, Illkirch,

Francia) según el protocolo del fabricante. Después de 24 horas, los cultivos se lavaron con medio SFM Opti-Pro™ (LifeTech). Los sobrenadantes virales se cosecharon 48 horas después de la transfección y se concentraron usando 20 concentradores centrífugos Vivaspin® (Sartorius, Bohemia, NY) hasta el volumen deseado (Sartorius, Bohemia, NY). La titulación lentiviral se determinó mediante expresión de GFP o TCR α/β usando una línea celular Jurkat TCR^{-/-}. Para cuantificar las titulaciones virales, se evaluó la expresión de GFP mediante análisis de citometría de flujo 48 a 72 horas postransducción. Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo CytoFLEX™ (Beckman Coulter). La titulación se calculó como el porcentaje de células que expresan GFP como TU/ml usando la fórmula: TU/ml = % de GFP⁺ x (cantidad de células usadas en la transducción) x (factor de dilución) x 1000.

Diez TCR huérfanos de este paciente se agruparon juntos para identificar sus antígenos afines usando la tecnología TargetScan del genoma completo. Este análisis identificó a MAGEA1 como una diana novedosa. La validación y deconvolución de los TCR huérfanos identificó dos TCR (HN-32-41 y HN-32-39) que reconocen el mismo epítipo novedoso de MAGEA1 presentado por HLA C*07:02, que es un alelo HLA expresado por ~28% de la población de Estados Unidos. Cabe destacar que el término «TCR32-39» también puede denominarse «TCR39» y el término «TCR32-41» también puede denominarse «TCR41».

(ii) Modificación de células T

Se aislaron células T CD8⁺ primarias usando el kit StraightFrom® Leukopak® CD8 Microbead (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células aisladas se congelaron en CryoStor® CS10 (Stem Cell Technologies) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. El día -1, se descongelaron las células T CD8⁺, se lavaron con medio de células T completo (RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, IL-2 [50U/mL, PeproTech, Cranbury, NJ] humana recombinante, IL-15 [5 ng/mL, R&D Systems] humana recombinante y IL-7 [5 ng/mL, (R&D Systems] humana recombinante). El día 0, se lavaron las células T CD8⁺ y se volvieron a suspender en medio de células T nuevo y se activaron con activador de células T CD3/CD28/CD2 humanas (5 µL/1 x 10⁶ células T CD8⁺, Stem Cell Technologies) de ImmunoCult™. El día 1, las células se lavaron y volvieron a suspender en medio de células T completo nuevo, y se colocaron en placas a 1x10⁶ células por pocillo en 11 pocillos. El día 1, las células se lavaron y volvieron a suspender en medio de células T completo nuevo, y se

colocaron en placas a 1×10^6 células por pocillo en 11 pocillos. Cada pocillo se transdujo con partículas lentivirales para expresar un único TCR huérfano o un TCR de control que se sabe que se dirige a un antígeno específico (10 TCR huérfanos + 1 TCR de control; 11 pocillos en total). El día 2, las células se lavaron y volvieron a suspender en medio de células T completo nuevo, y se expandieron hasta el día 5 en placas de 24 pocillos G-Rex® (Wilson Wolf). El día 5, las células se recogieron, se combinaron las transducciones individuales de 10 TCR huérfanos, mientras que las células transducidas con TCR de control se mantuvieron independientemente y las concentraciones celulares se ajustaron a 100×10^6 células T $CD8^+$ /mL en amortiguador de procesamiento MACS (Miltenyi) y se agregó anticuerpo de biotina anti-mTCR (BioLegend) a una dilución 1:50 durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó con amortiguador de procesamiento MACS. Se agregaron microperlas anti-biotina (Miltenyi) a una dilución 1:5 y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con amortiguador de procesamiento MACS y se volvieron a suspender en amortiguador de procesamiento MACS para la separación magnética manual usando un QuadroMACS Separator y columnas LS (Miltenyi). Las células aisladas se lavaron y volvieron a suspender en medio de células T completo nuevo y se expandieron en matraces G-Rex®10 (Wilson Wolf) hasta el día 12, en cuyo momento las células se congelaron en CryoStor® CS10 y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las células T $CD8^+$ que expresan ya sea el grupo de 10 TCR huérfanos o el TCR de control positivo se descongelaron, combinaron y volvieron a estimular (expandieron adicionalmente) mediante cultivo conjunto de células T con PBMC alogénicas irradiadas (60 grays) en presencia de 0,1 μ g/mL de anti-CD3 (OKT3, eBioscience) y 50 U/mL de IL-2 recombinante (PeproTech) en medio de células T nuevo (RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, IL-2 humana recombinante [50U/mL, PeproTech]) en matraces GRex®100 (Wilson Wolf). Se agregaron 50 U/mL de IL-2 recombinante para expandir las células día por medio hasta el día 6. El día 6, se reemplazó la mitad del medio de cultivo con medio de células T nuevo que contenía 50U/mL de IL-2 recombinante. Las células se usaron para análisis el día 7.

Se aislaron células T $CD3^+$ primarias de Leukopaks usando el kit StraightFrom® Leukopak® $CD3$ Microbead (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células aisladas se congelaron en CryoStor® CS10 (Stem Cell Technologies)

y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. El día -1, se descongelaron las células T CD3⁺, se lavaron con medio de células T completo (RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, IL-2 [50U/mL, PeproTech, Cranbury, NJ] humana recombinante, IL-15 [5 ng/mL, R&D Systems] humana recombinante y IL-7 [5 ng/mL, (R&D Systems] humana recombinante). El día 0, se lavaron las células T CD3⁺ y se volvieron a suspender en medio de células T nuevo y se activaron con activador de células T CD3/CD28/CD2 humanas (5 µL/1 x 10⁶ células T CD3⁺, Stem Cell Technologies) de ImmunoCult™. El día 1, las células se lavaron y volvieron a suspender en medio de células T completo nuevo, y se colocaron en placas a 1x10⁶ células por pocillo. Se transdujeron pocillos triplicados con partículas lentivirales para expresar ya sea TCR HN-32-41 o HN-32-39. El día 2, las células se lavaron, los triplicados se volvieron a suspender y se combinaron en medio de células T completo nuevo, y se expandieron hasta el día 5 en 1 pocillo de una placa de 6 pocillos G-Rex® (Wilson Wolf). El día 5, las células se recogieron y se ajustaron las concentraciones de células a 100 x 10⁶ células T CD3⁺/mL en amortiguador EasySep (StemCell Inc) y solución FcBlock con perlas magnéticas CD34 (Miltenyi) durante 30 minutos a 4C, se lavaron con amortiguador EasySep y se separaron usando QuadroMACS Separator y columnas LS (Miltenyi). Las células aisladas se lavaron y volvieron a suspender en medio de células T completo nuevo y se expandieron en matraces G-Rex®10 (Wilson Wolf) hasta el día 12, en cuyo momento las células se congelaron en CryoStor® CS10 y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

(iii) Diseño de biblioteca de péptidos

Se generó la biblioteca de péptidos del genoma humano completo embaldosando las secuencias codificantes del genoma humano que abarcan todas las proteínas del genoma humano con mosaicos de aminoácidos 90-mer superpuestos. Los mosaicos se sintetizaron en un chip de silicio (Twist Bioscience) y se clonaron en un vector de expresión de lentivirus.

(iv) Empaquetamiento y titulación de virus de biblioteca

Para generar células informantes que expresan la biblioteca de péptidos, las construcciones de biblioteca de péptidos se empaquetaron en primer lugar usando células Lenti-X™ (Takara Bio USA, Mountain View, CA). En resumen, las células Lenti-X™ se colocaron en placa a 75% de confluencia en un poliestireno CellBIND® cámara de 5 pilas CellSTACK® (Corning), y se transfectaron usando el reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Las

bibliotecas de péptidos se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® según el protocolo del fabricante. Se agregó medio SFM Opti-Pro™ (LifeTech) a 24 horas postransfección. Los sobrenadantes virales se cosecharon 48 horas después de la transfección y se concentraron usando 50 casetes Vivaflow® (Sartorius, Bohemia, NY). Se determinó la titulación lentiviral mediante formación de colonias de puromicina usando células Lenti-X™ con dilución en serie de sobrenadante viral. Para cuantificar la titulación viral, se seleccionaron colonias de resistencia a puromicina 48 horas postransducción. Se visualizaron colonias de resistencia a puromicina mediante tinción con cristal violeta y se contabilizaron. La titulación se calculó como la unidad formadora de colonias como TU/ml usando la fórmula: TU/ml = Cantidad de colonias de resistencia a puromicina x factor de dilución x 1000.

Las células informantes se generaron mediante inactivación de HLA-A/B/C endógeno en células HEK293T usando CRISPR y se modificaron para expresar una proteína fluorescente infrarroja activada por granzima (IFP) y una escramblasa activada por granzima (Ferretti et ál. (2020) Immunity 53:1095-1107). Las células informantes para los análisis se modificaron para expresar los seis alelos HLA expresados por el sujeto de los cuales se obtuvieron los TCR: HLA-A*01:01, A*03:01, B*07:02, B*08:01, C*07:01 y C*07:02 humanos (V1 P32 HEK Screps). Las células informantes (V1 P32 HEK Screps) se transdujeron con partículas lentivirales para expresar la biblioteca PEP LIB V2 PLUS con una MOI de 5 en DMEM completo (1X DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina). Esta biblioteca está compuesta por >600 000 construcciones (mosaicos) compuestas por 90 aminoácidos cada una, que representan el proteoma humano. El día después de la transducción, el medio DMEM completo se renovó y las células se mantuvieron en cultivo o se congelaron en DMEM completo complementado con DMSO al 10 % hasta que fueron necesarias.

(v) Cocultivo y enriquecimiento de células destruidas por granzima

El día 7 de la expansión de células T, se agregaron células T a las células informantes transducidas en biblioteca en una relación E:T de 2:1 y se incubaron a 37 °C durante cuatro horas. Después de la incubación, todas las células se recogieron mediante tripsinización y centrifugación, las células se volvieron a suspender en amortiguador de unión 1X Anexina V (Miltenyi Biotec) y se centrifugaron. Las células se volvieron a suspender con microperlas

magnéticas de Anexina V (Miltenyi Biotec) en amortiguador de unión 1X Anexina V (1 mL de microperlas en 9 mL de amortiguador de unión Anexina V por 1×10^9 células totales) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron con un volumen 5X de amortiguador de unión Anexina V y se centrifugaron. Las células se volvieron a suspender en amortiguador de unión Anexina V y luego se dividieron en 2 «megareps» y se filtraron usando un filtro de células de 70 μ M (Corning). Las células etiquetadas con Anexina V se seleccionaron positivamente usando un AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec). La elución de cada «megarep» se dividió adicionalmente entre cuatro «replicados» para un total de 8 replicados técnicos por análisis. Se clasificaron las células IFP⁺ usando un clasificador de células MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter) y se almacenaron en ADN/ARN Shield™ (Zymo Research) para el análisis posterior.

(vi) Secuenciamiento de próxima generación (NGS) y análisis de datos

Se extrajo ADN genómico usando el kit de purificación de ADN genómico GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se preparó para secuenciación NGS usando dos rondas de amplificación de PCR. En resumen, la primera ronda amplificó por PCR el casete de péptidos y la segunda ronda agregó adaptador de secuenciación e índices de muestra antes de la secuenciación usando un instrumento Illumina NextSeq™ (Illumina, San Diego, CA).

Las secuencias de nucleótidos se mapearon en mosaicos de nucleótidos individuales. La proporción de conteos de lectura para cada mosaico se calculó para cada replicado del análisis (n=8) y para la entrada de cada grupo de células informantes transducidas, y los enriquecimientos de cada mosaico se calcularon dividiendo la proporción del mosaico en el replicado de análisis entre la proporción del mosaico en la biblioteca de entrada. Una media geométrica modificada del enriquecimiento de un mosaico idéntico entre los 8 replicados del análisis se usó para identificar los aciertos de análisis reproducibles.

25 b. Descubrimiento de TCR

(i) Identificación de la restricción de HLA

Dado que las células informantes usadas en el análisis del genoma completo expresaron seis alelos HLA: A*01:01, A*03:01, B*07:02, B*08:01, C*07:01 y C*07:02; fue necesario deconvolucionar la restricción de HLA para el epítipo de MAGEA1 identificado. Se transdujeron células informantes HEK monoalélicas que expresan individualmente cada uno de los 6 alelos HLA con partículas lentivirales a una MOI de 1 para expresar un fragmento de

90 aminoácidos individual que representa el mosaico de MAGEA1 con la mejor puntuación del análisis. Las células se seleccionaron con puromicina (1,5 ug/mL) en DMEM completo. Las células se recogieron un día antes del cultivo conjunto con el grupo de células T en una relación E:T de ~2:1. Después de 4 horas, los cultivos conjuntos se recogieron mediante pipeteo y se detectó la fluorescencia del informante usando un instrumento CytoFLEX™ S (Beckman Coulter).

(ii) Identificación del TCR correspondiente

Para identificar el TCR correspondiente del grupo de células T transducidas con TCR, células HEK293T C*07:02 monoalélicas MHC modificadas para expresar el MAGEA1 90mer se cocultivaron con el grupo de células T en una relación E:T de 1:1 durante 16-24 horas. Las células T se mezclaron, recogieron mediante pipeteo y se etiquetaron con un kit de microperlas CD137 (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células T se tiñeron en primer lugar con anti-CD137 etiquetado con PE y anti-CD69 etiquetado con AF647 (BioLegend), se lavaron y luego se etiquetaron con microperlas anti-PE. Las células etiquetadas se enriquecieron con un Pro separador autoMACS® (Miltenyi) y las células doble positivas para CD137 y CD69 se clasificaron en un clasificador celular Astrios™ MoFlo® (Beckman Coulter). El ADN genómico se extrajo de las células clasificadas y el casete de expresión de TCR se amplificó por PCR y se preparó para el secuenciamiento de próxima generación (NGS).

(iii) Predicción de péptidos y verificación de la diana

Las secuencias de péptidos superpuestas con un puntaje >2,5 veces se usaron para predecir la unión de MHC con NetMHC4.0 (disponible en Internet en cbs.dtu.dk) y se sintetizaron los péptidos de unión de MHC con mayor predicción (Genscript). Se pulsaron células informantes HEK293T C*07:02 monoalélicas con diluciones en serie de 0 – 20 000 ng/ml de cada candidato peptídico durante 1 hora y luego se cocultivaron con las células T transducidas con TCR (HN-32-39 o HN-32-41) en una relación E:T de ~1:1. Después de 4 horas, los cultivos se cosecharon mediante pipeteo y se detectó la fluorescencia del informante usando un instrumento CytoFLEX™ S (Beckman Coulter). Adicionalmente, se pulsaron células de suspensión HEK293 C*07:02 monoalélicas con diluciones en serie de 0-500 pM de péptido VRFFFPSL durante 2 horas y luego se cocultivaron con las células T transducidas con TCR (HN-32-39 o HN-32-41) en una relación E:T de 1:1 durante la noche. Luego, se recogieron las

células mediante pipeteo y se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se recogió para la medición de IFN γ usando un ensayo single-plex de 3a generación de IFN γ humana (Protein Simple).

c. Caracterización de TCR

5 (i) Ensayo de reconocimiento de células T

Para detectar la reactividad a las líneas de células cancerosas, las líneas de células cancerosas de tipo silvestre se cosecharon en una placa de fondo plano de 96 pocillos y se dejaron reposar durante la noche a 37°C en CO $_2$ al 5%. Al día siguiente, se descongelaron las células T, se lavaron en medio RPMI-1640 completo y se agregaron a los pocillos para una
10 relación de efector a diana (E:T) de 1:1 para la medición de IFN γ o 1:4 para el análisis de citometría de flujo de los marcadores inducidos por activación. El cocultivo se incubó durante 16 horas. Luego, las células se cosecharon mediante pipeteo, se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo en V y se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se recogió para la medición de IFN γ usando un ensayo single-plex de 3a generación de IFN γ
15 humana (Protein Simple). Para el análisis de citometría de flujo (instrumento Cytoflex S™, Beckman Coulter), los sedimentos celulares se lavaron con amortiguador FACS (PBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 mM) y se tiñeron para marcadores inducidos por activación, que incluyen anti-CD137 conjugado con PE (Miltenyi), anti-CD69 conjugado con AF647 (Biolegend) y anti-CD8 conjugado con BV421 (BioLegend).

20 (ii) Cultivo de células cancerosas y transducción Incucyte® NucLight™ Red

Las líneas de células cancerosas se adquirieron de ATCC (Manassas, VA) y las células HEK293T eran originalmente de Takara Bio (Shiga, Japón). Todos los medios se complementaron con FBS al 10%, salvo U266B1 que requirió FBS al 15 %, y penicilina al 1% y se incubaron a 37°C en CO $_2$ al 5%. Las células A101D (células con expresión elevada de
25 MAGE-A1; TPM: 359), A2058 (células con expresión media de MAGE-A1; TPM: 128), HS294T y HEK293T se mantuvieron en DMEM completo. Se cultivó SK-MEL-5 en EMEM completo, mientras que U266B1, NCIH1437 y 786-O requirieron RPMI completo. Las células cancerosas no transducidas se mantuvieron en preparación para el ensayo de reconocimiento de células T, y 10 ^{6} células de cada línea celular se introdujeron con reactivo de lentivirus Incucyte®
30 NucLight™ Red (Sartorius, Göttingen, Alemania). Las células etiquetadas positivamente se seleccionaron usando 1,5 ug/mL de puomicina durante 72 horas.

(iii) Ensayo de citotoxicidad Incucyte®

Se cosecharon células cancerosas seleccionadas para el análisis Incucyte® NucLight™ en placas de fondo plano de 96 pocillos (Corning, Flintshire, Reino Unido) a 10^4 células. El mismo día, las células T se descongelaron, se lavaron en RPMI-1640 completo y se dejaron descansar durante la noche en medio con 50 U/mL de IL-2 (PeproTech), 5 ng/mL de IL-7 y 5 ng/mL de IL-15 (R&D Systems). Todas las células se dejaron descansar durante la noche a 37°C en CO₂ al 5%. Se realizó una dilución en serie de las células T para las relaciones de efector a diana, donde la E:T más alta se encuentra en 4:1, y la más baja se encuentra en 1:4. Se tomó una imagen de cada pocillo completo de dos replicados técnicos cada 2 horas durante un período de 72 horas. La imagenología utilizó una lente objetiva 4x y se analizaron los datos usando el software básico Incucyte®. El tiempo de adquisición del canal rojo fue de 400 ms y se restó la referencia al permitir la segmentación Top-Hat. Se aplicó división de márgenes para que el software pudiera reconocer las células estrechamente separadas como múltiples objetos, en lugar de un solo objeto, en caso de ausencia de la configuración.

15

(d) Alorreactividad y análisis de seguridad

(i) *Generación de matrices que expresan MHC basadas en 96 pocillos para análisis de alorreactividad*

Se inactivaron HLA-A/B/C endógenos en células HEK293T usando ingeniería CRISPR-Cas. Los ARN guía (ARNg) se diseñaron contra secuencias conservadas en los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C usando la herramienta multicrispr.net (Prykhodzhiy et ál., Plos One, 2015). Se seleccionaron las siguientes guías: CRISPR-ALL-1: CGGCTACTACAACCAGAGCG, CRISPR-ALL-2: AGATCACACTGACCTGGCAG, CRISPR-ALL-3: AGGTCAGTGTGATCTCCGCA. Se clonaron ARNg en el vector LentiCRISPR V2 usando sitios BsmBI. Se transfectaron células HEK293T con construcciones guía de plásmidos usando Mirus TransIT (Mirus Bio, Madison, WI). Después de 7 días, se clasificaron células con inactivación de MHC (MHC-KO) usando un anticuerpo pan-MHC (BioLegend). Se expandieron los clones de células individuales y se comprobó la ausencia de MHC mediante citometría de flujo. Se usaron células con inactivación de B2M (B2M-KO) como control positivo para la ausencia completa de expresión de MHC en la superficie. Se inactivó B2M en células HEK293T mediante electroporación de RNP de CRISPR que se dirigen a B2M usando el ARN guía:

30

GGCCACGGAGCGAGACATCT.

Se transdujeron células HEK293T sin MHC con virus IncuCyte® NucLight™ (Essen BioScience). Las células transducidas se clasificaron para la expresión de NucLight™ Red usando un clasificador Sony SH800. Para generar una matriz que expresa MHC, se transdujeron células HEK293T que expresan NucLight™ Red sin MHC con los 110 MHC más comunes (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT) en pocillos individuales en placas de 96 pocillos. Las células transducidas se seleccionaron con nourseotricina (400 µg/ml) durante una semana. Las células que expresan los 110 MHC más comunes se hicieron pasar y se almacenaron en placas de 96 pocillos como una matriz. La expresión de los alelos de MHC individuales se comprobó mediante tinción usando un anticuerpo pan-MHC (BioLegend).

Para generar el control positivo para el ensayo, se transdujeron células HEK293T sin MHC con virus IncuCyte® NucLight™ Red (Essen BioScience) y se clasificaron para la expresión de NucLight™ Red usando un clasificador Sony SH800. Luego, se introdujo HLA-C*07:02 (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT) en las células usando transducción lentiviral. Las células transducidas se seleccionaron con nourseotricina (400 µg/ml) durante una semana. Luego, estas células se transdujeron con una construcción de 90-mer (pHAGE-CMV-FHA-MAGE-A1-EFS-AmCyan) que expresa un fragmento de MAGE-A1, que contiene el epítipo de MAGE-A1 (VRFFFPSL). Las células transducidas luego se clasificaron para la expresión de AmCyan usando un Bigfoot Spectral Cell Sorter (Thermo Fisher Scientific).

(ii) *Empaquetamiento y transducción lentiviral*

Para empaquetar los lentivirus de las 110 construcciones de expresión de MHC (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT), se colocaron en placas células HEK293T sin MHC con una confluencia del 75 % en 96 pocillos y se transfectaron usando el reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Las construcciones de expresión de MHC individuales se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se agregó medio DMEM a las 24 horas después de la transfección. Los sobrenadantes virales se recogieron 48 horas después de la transfección y se usaron para la transducción de los 110 MHC en un formato de matriz basada en 96 pocillos. Para empaquetar los lentivirus de otras construcciones, se colocaron en placas células Lenti-X® (Takara Bio USA, Mountain View, CA) con una confluencia del 75 % y se transfectaron usando un reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia).

Las construcciones de expresión se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se agregó medio SFM OptiPRO™ a las 24 horas después de la transfección. Los sobrenadantes virales se cosecharon 48 horas después de la transfección y se concentraron usando 20 concentradores centrífugos Vivaspin® o 50 casetes Vivaflow® (Sartorius, Bohemia, NY).

Toda transducción viral que implicó líneas celulares derivadas de células HEK293T se realizó con polibreno (4 µg/ml).

(iii) *Cultivo conjunto para perfilado de alorreactividad*

Se modificaron células pan T como se describió anteriormente y se congelaron. El día 0, se volvieron a estimular las células T en matraces T25 verticales con 1,0E+6 células T, 20,0E+6 PBMC irradiadas, IL-2 humana recombinante y anticuerpo monoclonal CD3 (OKT3) [0,1 µg/mL, eBioscience]. La mitad del volumen del medio se intercambié los días 2, 4, 5 y 6 con RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino [FBS] inactivado por calor al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e IL-2 humana recombinante [50 U/mL, PeproTech, Cranbury, NJ]. Las células se recogieron para análisis el día 7.

El ensayo se llevó a cabo por triplicado. El día 5, las células diana en la matriz de 96 pocillos se hicieron pasar y se recogieron en placas de 384 pocillos. El día 6, las células T CD8⁺ modificadas que expresan el TCR HN-32-41 o las células T de control no transducidas se agregaron en una relación de efector a diana (E: T) de 5:1 y se incubaron con células diana durante 48 horas. Los números de células diana se midieron con el tiempo usando IncuCyte® midiendo la cantidad de células positivas para NucLight™ Red. La inhibición celular a las 48 h mediante el TCR recombinante de interés en cada MHC en el ensayo se calculó como 1- (Duplicación celular[Incubado con células T que expresan HN-32-41]/Duplicación celular[Incubado con células T de control no transducidas]).

(iv) *Generación de células T CD8 que expresan TCR HN-32-41 para análisis de seguridad*

Se prepararon células T CD8⁺ primarias como se describió anteriormente para expresar HN-P32-41. Pocillos triplicados se transdujeron con partículas lentivirales para expresar HN-32-41 combinado en medio de células T completo nuevo, y se expandieron hasta el día 5 en un recipiente de cultivo G-Rex®10 (Wilson Wolf). El día 5, las células se recogieron y se ajustaron las concentraciones de células a 100 x 10⁶ células T CD3⁺/mL en amortiguador EasySep

(StemCell Inc) y solución FcBlock con perlas magnéticas CD34 (Miltenyi) durante 30 minutos a 4°C, se lavaron con amortiguador EasySep y se separaron usando QuadroMACS® Separator y columnas LS (Miltenyi). Las células aisladas se lavaron y volvieron a suspender en medio de células T completo nuevo y se expandieron en matraces G-Rex®10 (Wilson Wolf) hasta el día 12, en cuyo momento las células se congelaron en CryoStor® CS10 y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Las células T CD8+ que expresan HN-32-41 se descongelaron y se volvieron a estimular (expandieron adicionalmente) mediante cultivo conjunto de células T con PBMC alogénicas irradiadas (60 grays) en presencia de 0,1 µg/mL de anti-CD3 (OKT3, eBioscience) y 50 U/mL de IL-2 recombinante (PeproTech) en medio de células T nuevo (RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, IL-2 humana recombinante [50 U/mL, PeproTech]) en matraces GRex®100 (Wilson Wolf). Se agregaron 50 U/mL de IL-2 recombinante para expandir las células día por medio hasta el día 6. El día 6, se reemplazó la mitad del medio de cultivo con medio de células T nuevo que contenía 50U/mL de IL-2 recombinante. Las células se usaron para análisis el día 7.

(v) *Control de calidad (QC) de destrucción de células T dentro de la diana*

El día 5 de la reestimulación, las células informantes (que expresan la biblioteca de peptidoma) se etiquetaron con CellTrace™ Violet (Thermo Fisher) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción de etiquetado se inactivó con un exceso 5X de medio DMEM completo (1X DMEM complementado con FBS al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin). Después de la centrifugación, las células se sembraron para los ensayos posteriores. Para el análisis fuera de la diana, se sembraron 400×10^6 células informantes etiquetadas en un matraz CellSTACK®. Para QC de destrucción de células T dentro de la diana, se sembraron 25 000 células informantes por pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos.

El día 6 de reestimulación de HN-32-41, se analizaron las células T para determinar la actividad contra el péptido MAGE-A1. Como control positivo, se pulsó una fracción de células informantes con 100 ng/mL de péptido MAGE-A1 (Genscript) durante una hora. Las células T se agregaron a las células informantes en cuatro relaciones de efector:diana (E:T) (2:1, 1:1, 1:2, 1:4) por triplicado. Después de cuatro horas de incubación a 37 °C, las células se volvieron

a suspender mediante pipeteo ascendente y descendente antes de la adquisición de datos en un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter).

(vi) *Cultivo conjunto de análisis, enriquecimiento y clasificación de células diana*

El día 7 de la expansión de HN-32-41, se agregaron células T a las células informantes transducidas en biblioteca y se incubaron a 37 °C durante cuatro horas. Después de la incubación, todas las células se recogieron mediante tripsinización y centrifugación, las células se volvieron a suspender en amortiguador de unión 1X Anexina V (Miltenyi Biotec) y se centrifugaron. Las células se volvieron a suspender con microperlas magnéticas de Anexina V (Miltenyi Biotec) en amortiguador de unión 1X Anexina V (1 mL de microperlas en 9 mL de amortiguador de unión Anexina V por 1×10^9 células totales) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron con un volumen 5X de amortiguador de unión Anexina V y se centrifugaron. Las células se volvieron a suspender en amortiguador de unión Anexina V y luego se dividieron en 2 «megareps» y se filtraron usando un filtro de células de 70 μ M (Corning). Las células etiquetadas con Anexina V se seleccionaron positivamente usando un AutoMACS® Pro (Miltenyi Biotec). La elución de cada «megarep» se dividió adicionalmente entre cuatro «replicados» para un total de 8 replicados técnicos por análisis. Se clasificaron células IFP⁺ usando un clasificador de células MoFlo® Astrios EQ (Beckman Coulter).

(vii) *Secuenciación de última generación*

Se extrajo ADN genómico (ADNg) de las células clasificadas usando el kit de purificación de ADN genómico GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific). El casete de antígeno se amplificó del ADNg extraído mediante PCR y luego se juntó con adaptadores de secuenciación y secuencias de índice específico de la muestra en una segunda reacción de PCR. Los amplicones se secuenciaron en una máquina Illumina NextSeq™ usando el cebador de secuenciación Illumina estándar.

(viii) *Análisis de los datos*

Las secuencias de nucleótidos se mapearon en mosaicos de nucleótidos individuales. La proporción de conteos de lectura para cada mosaico se calculó para cada replicado del análisis (n=8) y para la entrada de cada grupo de células informantes transducidas, y los enriquecimientos de cada mosaico se calcularon dividiendo la proporción del mosaico en el replicado de análisis entre la proporción del mosaico en la biblioteca de entrada. Una media

geométrica modificada del enriquecimiento de un mosaico idéntico entre los 8 replicados del análisis se usó para identificar los aciertos de análisis reproducibles. Los epítomos candidatos para cada mosaico se seleccionaron mediante la identificación de epítomos de unión fuertes predichos compartidos por mosaicos adyacentes y redundantes superpuestos que se enriquecieron en el análisis.

e. Evaluación de seguridad de HN-32-41

(i) Validación de 90-mer

Aciertos fuertes del análisis de seguridad se evaluaron en primer lugar usando 90-mer. Se transdujeron células informantes HEK monoalélicas que expresan HLA C*07:02 con partículas lentivirales con una MOI de 1 para expresar un fragmento de 90 aminoácidos individual que representa los mosaicos fuera de la diana con mejor puntuación del análisis (por ejemplo, LAMB4-IR, PIGO, SLC6A13, TLE3, BTBD2, SLC6A12 y RXFP1). Las células se seleccionaron con puromicina (1, 5 ug/mL) en DMEM completo. Las células se sembraron un día antes del cultivo conjunto con las células T que expresan HN-32-41 en una relación E:T de ~2:1. Después de 4 horas, los cultivos conjuntos se recogieron mediante pipeteo y se detectó la fluorescencia del informante usando un instrumento CytoFLEX™ S (Beckman Coulter).

(ii) Validación de ORF

Los aciertos que validaron como dianas el uso de 90-mers se hicieron avanzar al análisis contra los marcos de lectura abiertos (ORF) de proteína completa. Los ORF para TLE3 y SLC6A13 se clonaron de la ORFeome Collaboration Library (Horizon). Se sintetizó el ORF de retención de intrones LAMB4 (GenScript). Estos clones se clonaron en vectores de sobreexpresión lentiviral y se administraron a células informantes HEK C*07:02 mediante transducción seguida de selección con puromicina. Las células se sembraron un día antes del cultivo conjunto con las células T que expresan HN-32-41 en una relación E:T de ~2:1. Después de 4 horas, los cultivos conjuntos se recogieron mediante pipeteo y se detectó la fluorescencia del informante usando un instrumento CytoFLEX™ S (Beckman Coulter). El clon ORF PIGO se adquirió de Genscript en el vector de sobreexpresión de pcDNA3.1 y se administró mediante transfección transitoria usando el reactivo FuGENE6 (Promega). Se sembraron células informantes HEK C*07:02 para que se adhirieran durante la noche, luego se transfectaron transitoriamente con el ORF PIGO. El medio se renovó, luego las células se

expandieron durante la noche. Las células se cultivaron en conjunto con las células T que expresan HN-32-41 en una E:T de ~2:1. Después de 4 horas, los cultivos conjuntos se recogieron mediante pipeteo y se detectó la fluorescencia del informante usando un instrumento CytoFLEX™ S (Beckman Coulter).

5 (iii) *Validación de péptidos*

Las dianas que mostraron reactividad de HN-32-41 contra ORF de longitud completa se hicieron avanzar al análisis contra péptidos. Se usó MHC-Flurry (O'Donnell *et ál.* (2020) *Cell Systems* 42-48.e7) para predecir los péptidos de LAMB4-IR con unión de alta afinidad a C*07:02. Se sintetizaron los péptidos de unión elevada predichos (GenScript). Se pulsaron
10 células informantes HEK293T C*07:02 monoalélicas con diluciones en serie de 0-20 000 ng/ml del mejor candidato peptídico durante 1 hora y luego se cocultivaron con las células T transducidas con TCR (HN-32-41) en una relación E:T de ~2:1. Después de 4 horas, los cultivos se cosecharon mediante pipeteo y se detectó la fluorescencia del informante usando un instrumento CytoFLEX™ S (Beckman Coulter).

15 (iv) *Cultivo conjunto con células primarias normales*

Se obtuvieron las células primarias normales de donantes C*07:02+ que se expandieron, confirmadas para mantener los estados de diferenciación, y se congelaron (Lonza). Las muestras analizadas incluyen: Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC (CC-2517)), células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas del pulmón (SAEC (CC-2547)) y
20 células epiteliales bronquiales-traqueales del pulmón (NHBE (CC-2540)).

Antes de los ensayos de cocultivo, las células normales primarias se descongelaron, se lavaron, se volvieron a suspender en medio RPMI complementado con IL-2, IL-7 e IL-15 y se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 200 000 células/pocillo y se dejaron reposar durante 4 horas. Las células se pulsaron con péptido
25 MAGE-A1 durante 1-2 horas o se dejaron sin pulsar en sus respectivos medios. Las células T HN-32-41 o no transducidas (NTD) luego se agregaron a una densidad de 100 000 células/pocillo en medio de células T completo. 24 horas después del cultivo conjunto, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80 °C). Los sobrenadantes luego se descongelaron y analizaron para determinar los niveles de IFN-γ cargándolos en un cartucho
30 Simple Plex Human IFN-gamma (3a Gen) (ProteinSimple, San Jose, CA) usando el instrumento Ella™.

Para el análisis de citometría de flujo (instrumento Cytoflex S™, Beckman Coulter), los sedimentos celulares se lavaron con amortiguador FACS (PBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 mM) y se tiñeron para marcadores inducidos por activación, que incluyen anti-CD137 conjugado con PE (Miltenyi), anti-CD69 conjugado con AF647 (Biolegend) y anti-CD8 conjugado con BV421 (BioLegend).

Ejemplo 2: Identificación de epítomos inmunogénicos de MAGEA1 y proteínas de unión a estos

Se desarrolló y aplicó una plataforma de descubrimiento de antígenos de alta resolución que permite la rápida identificación de TCR de un grupo de TCR obtenidos de una muestra de tumor disociada que reconocen péptidos inmunogénicos presentados por moléculas de MHC para identificar los péptidos inmunogénicos reconocidos (ver Ejemplo 1). Los péptidos antigénicos de MAGEA1, que es un gen cuya expresión está asociada con determinados trastornos como cáncer y que no se expresa normalmente en los tejidos fuera de los testículos (Figura 1), se identificaron como reconocidos por TCR que se expandieron luego del bloqueo de los puntos de control inmunitario en muestras de tumor de cabeza y cuello (Figura 2A). La evaluación adicional reveló que HLA-C*07:02 presentó el péptido antigénico (Figura 2B).

Las secuencias comunes compartidas por los mosaicos superpuestos de la biblioteca de secuencias analizadas y los análisis bioinformáticos permitieron la identificación de secuencias peptídicas MAGEA1 inmunogénicas (ver la Tabla 1 y la Figura 2C para péptidos inmunogénicos representativos). Ver también las Figuras 2D y 2E para una validación de péptido inmunogénico representativo que indica que el péptido VRFFFPSL mostró la inmunogenicidad más favorable.

El péptido inmunogénico representativo dentro de una construcción 90-mer luego se usó para analizar grupos de células T transducidas con TCR y se identificaron los aciertos, tales como TCR 39 y TCR 41 (Figuras 3A y 3B). Se demostró además que los TCR 39 y 41 representativos reconocen y destruyen células cancerosas que expresan MAGEA1 en varios niveles (Figuras 4-6). Además, el TCR 41 representativo se analizó en un ensayo de alorreactividad. El TCR41 demostró alorreactividad mínima generalmente como se define mediante la inhibición de la célula diana de más de 20 % (por ejemplo, ausencia de alorreactividad detectable a ninguno de los 110 tipos de HLA diferentes analizados) (Figura 7), no reaccionó considerablemente

con las células que expresan supuestos sitios fuera de la diana (Figuras 8 y 9), y no reaccionó con células primarias humanas sanas (Figura 10). Además, se cree que la supresión de la señalización de TGF β , tal como mediante el uso de DN-TGF β RII, puede potenciar los efectos anticancerosos y la eficacia de (ver la FIG. 11, cuya descripción se proporciona en la presente, y la Tabla 3 para construcciones de expresión no taxativas representativas).

Por lo tanto, se han identificado pares de TCR-antígeno fisiológicamente pertinentes en el contexto de moléculas de MHC.

Incorporación mediante referencia

- 10 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente que se mencionan en la presente se incorporan en su totalidad mediante esta referencia como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara de forma específica e individual como incorporada mediante referencia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluyendo las definiciones en la presente.
- 15 También se incorporan por referencia en su totalidad cualesquiera secuencias de polinucleótidos y polinucleótidos a las que hace referencia un número de acceso que se correlaciona con una entrada de una base de datos pública, tal como las que mantiene el Instituto de Investigación Genómica (TIGR, por sus siglas en inglés) en la página web tigr.org y/o el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) en la
- 20 página web ncbi.nlm.nih.gov.

Equivalentes y alcance

- Los detalles de una o más modalidades comprendidas por la presente invención se establecen en la descripción anterior. Aunque se han descrito anteriormente materiales y métodos
- 25 representativos, a modo de ejemplo, cualquier material y método similar o equivalente a los descritos en la presente se puede usar en la práctica o prueba de las modalidades abarcadas por la presente invención. Otras características, objetos y ventajas relacionados con la presente invención son evidentes a partir de la descripción. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo
 - 30 significado que los que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción provista

anteriormente.

Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar utilizando nada más que los experimentos de rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas comprendidas por la presente invención y descritas en la presente. No se pretende que el
5 alcance de la presente invención se limite a la descripción provista en la presente y se pretende que los equivalentes estén comprendidos por las reivindicaciones adjuntas.

También se señala que la expresión «que comprende» se propone que sea abierto y permite, pero no requiere la inclusión de elementos o pasos adicionales. Cuando la expresión «que comprende» se usa en la presente, la expresión «que consiste en» también se abarca y se
10 describe.

Cuando se proporcionan intervalos se incluyen los extremos. Asimismo, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario o resulta evidente a partir del contexto y del conocimiento del experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden tomar cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos indicados en diferentes modalidades
15 comprendidas por la presente invención, hasta un décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, se debe entender que cualquier modalidad particular comprendida por la presente invención comprendida por la técnica previa se puede excluir explícitamente de una o más cualesquiera de las reivindicaciones. Dado que tales modalidades se consideran conocidas
20 para un experto en la técnica, pueden excluirse, aunque la exclusión no se establezca explícitamente en la presente. Cualquier modalidad particular de las composiciones comprendidas por la presente invención (por ejemplo, cualquier antibiótico, agente terapéutico o principio activo, cualquier método de producción, cualquier método de uso, etc.) se puede excluir de una o más de las reivindicaciones, por cualquier razón, ya sea que esté o no
25 relacionada con la existencia de la técnica previa.

Se debe entender que los términos que se han usado son términos descriptivos, en lugar de limitativos, y es posible hacer cambios en el alcance de las reivindicaciones adjuntas sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención en sus aspectos más amplios.

Si bien se ha descrito la presente invención en cierto detalle y con cierta particularidad con
30 respecto a varias modalidades descritas, no se pretende que se limite a ninguna particularidad, modalidad o modalidad particularidad, sino que se debe interpretar con referencia a las

reivindicaciones anteriores para proveer la interpretación más amplia posible de dichas reivindicaciones a la luz de la técnica previa y, por consiguiente, comprender efectivamente el alcance deseado comprendido por la presente invención.