

P- 2021/43109

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2021/0016480**

Solicitud de patente a nombre de **REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. y MEDIGENE IMMUNOTHERAPIES GMBH.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., domiciliada en Estados Unidos de América, y MEDIGENE IMMUNOTHERAPIES GMBH., domiciliada en Alemania, solicitantes de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **3035** notificado electrónicamente el 04 de marzo de 2025, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, y para el cual oportunamente solicité prórroga el 22 de mayo de 2025, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificación al capítulo reivindicatorio:

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de trece (13) reivindicaciones, el cual reemplaza completamente el documento presentado el 16 de diciembre de 2024. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

1.1 Se modificó la reivindicación 1 con el fin de:

- Aclarar que la célula comprende un polinucleótido policistrónico que codifica un TCR de MAGEA4 y un polinucleótido policistrónico que codifica

un convertidor de señal TGF β quimérico que responde a IL-12. Dicha modificación se sustenta en los ejemplos 1 y 3 de la descripción.

- Aclarar las opciones de la combinación de secuencias de aminoácidos de la cadena alfa y cadena beta del TCR MAGEA4 de acuerdo con los ejemplos de la solicitud.

1.2 Se modificaron las reivindicaciones 2 y 4 con el fin de eliminar la mención al TCR de MAGEA4.

1.3 Se modificaron las reivindicaciones 3 y 5 con el fin de aclarar que el TCR de MAGEA4 es un polipéptido de fusión que comprende la cadena alfa y la cadena beta. Esta modificación encuentra soporte en la página 37 de la descripción en donde se menciona: *"el eTCR de MAGEA4 se expresa como un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 7"*, así como en la página 84, que señala *"una proteína de fusión que codifica un eTCR de MAGEA4 (SEQ ID NO: 7) que comprende una cadena eTCR α (SEQ ID NO: 5) y una cadena eTCR β (SEQ ID NO: 6)"*

1.4 Se eliminó la antigua reivindicación 13. Por lo tanto, se ajustó la numeración de la antigua reivindicación 14, ahora 13.

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, ya que se encuentran sustentadas tanto en la descripción como en el listado de secuencias, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

2. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020**.

3. Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por el examinador en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas del examinador, me permito manifestar lo siguiente:

3.1 El examinador ha planteado una objeción a la reivindicación 1 por carecer de sustento en la descripción. En concreto, la reivindicación reclama una célula que comprende un TCR de MAGEA4 y un receptor TGF β quimérico, en donde el TCR MAGEA4 comprende una cadena alfa de SEQ ID NO: 2 o 5 y una cadena beta que comprende SEQ ID NO: 3 o 6, y en el que el receptor TGF β quimérico comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8. Sin embargo, la solicitud no enseña evidencia técnica de una célula que comprende el TCR y el receptor TGF β quimérico de la estructura mencionada, ni ha explorado múltiples combinaciones de secuencias de cadena alfa y beta, como indica la reivindicación.

Sin estar de acuerdo con las objeciones planteadas, pero con el fin de avanzar en el trámite de la solicitud, se ha modificado la reivindicación 1 para reclamar “*una célula que comprende un polinucleótido policistrónico que codifica un TCR de MAGEA4...*”, cuya estructura comprende cadena alfa de secuencia SEQ ID NO: 2 y una cadena beta de secuencia SEQ ID NO: 3, o una cadena alfa de secuencia SEQ ID NO: 5 y una cadena beta de secuencia SEQ ID NO: 6.

Esta modificación se encuentra alineada con el ejemplo 1, que señala:

*Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano se activaron con anti-CD3 (50 ng/ml) y anti-CD28 (50 ng/ml) solubles y se transdujeron (MOI=20) con vectores lentivíricos (LVV) que expresan (i) un TCR de MAGEA4 (p. ej., **SEQ ID NO: 4**), o (ii) un TCR de MAGEA4 y un convertidor de señal*

de TGFβ quimérico que responde a IL-12 (CTBR12), p. ej., SEQ ID NO: 4 y 8, codificada en vectores separados. Después de 10 días de cultivo en medios que contenían IL2, se recolectó el producto celular para análisis in vitro y se crioconservó.

En el ejemplo 3, que indica:

*"Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano se activaron con anti-CD3 (50 ng/ml) y anti-CD28 (50 ng/ml) solubles y se transdujeron (MOI=20) con vectores lentivíricos (LVV) que expresan (i) un TCR mejorado por emparejamiento de MAGEA4 (eTCR), (p. ej., **SEQ ID NO: 7**), o (ii) un eTCR de MAGEA4 y un receptor de CTBR12 (p. ej., SEQ ID NO: 7 y 8) codificado en el mismo vector. Después de 10 días de cultivo en medios que contenían IL2, se recolectó el producto celular para análisis in vitro y se crioconservó"*

Y en la página 84, que señala:

*"...un polinucleótido policistrónico que codifica un TCR de MAGEA4 (**SEQ ID NO: 4**) que comprende una cadena **TCRα (SEQ ID NO: 2)** y una cadena **TCRβ (SEQ ID NO: 3)** y un polinucleótido policistrónico que codifica un CTBR (SEQ ID NO: 8) se introducen en una célula mediante el uso de vectores no víricos o víricos. En modalidades particulares, un polinucleótido policistrónico que codifica una proteína de fusión que codifica un eTCR de MAGEA4 (**SEQ ID NO: 7**) que comprende una cadena **eTCRα (SEQ ID NO: 5)** y una cadena **eTCRβ (SEQ ID NO: 6)** y un polinucleótido policistrónico que codifica un CTBR (SEQ ID NO: 8) se introducen en una célula mediante el uso de vectores no víricos o víricos."*

En consecuencia, la reivindicación modificada 1 se encuentra completamente soportada por la descripción y el solicitante solicita respetuosamente que se retiren estas objeciones.

3.2 El examinador también objeta la reivindicación 4 por carecer de sustento en la descripción debido a que se refiere a una cadena beta del TCR de MAGEA4 que

comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 6. Sin embargo, la solicitud no enseña evidencia técnica de una célula que comprende el TCR que comprenda la estructura señalada.

El solicitante discrepa respetuosamente de la opinión del examinador ya que este mismo reconoce que existe soporte del par de secuencias SEQ ID NO: 5 y 6, por lo que la reivindicación 4 está apoyada por la descripción. Además, SEQ ID NO: 7 es un péptido de fusión que comprende SEQ ID NOs: 5 y 6 y se ejemplifica en el Ejemplo 3. El solicitante presenta la descripción modificada (anexo 3) para corregir los errores evidentes de los Ejemplos. Adicionalmente, con el fin de avanzar en el proceso, el solicitante ha modificado la reivindicación 4 para eliminar la mención al TCR de MAGEA4.

Por las razones expuestas, se solicita respetuosamente al examinador que reconsidere su opinión y dé por superada la presente objeción.

3.3 Adicionalmente, el examinador objeta la reivindicación 5 por carecer de claridad debido a que se refiere a la SEQ ID NO: 7 sin definir la relación de dicha secuencia con la cadena alfa o beta. Adicionalmente, no tiene sustento en la descripción porque no se evidencia en el TCR de MAGEA4 o del receptor TGF β quimérico la SEQ ID NO: 7.

Sin estar de acuerdo con las objeciones planteadas, pero con el fin de avanzar en el proceso, se ha modificado la reivindicación 5 para señalar que el TCR de MAGEA4 es un polipéptido de fusión que comprende la cadena alfa y beta, en el que el polipéptido de fusión comprende SEQ ID NO: 7. En ese sentido es posible dar por superada la presente objeción.

3.4 Por último, el examinador considera que las reivindicaciones 13 y 14 carecen de concisión y no tienen sustento en la descripción debido a que reclaman una composición en más de una reivindicación y no hay evidencia técnica de la obtención de una composición o composición farmacéutica que comprenda la célula que contiene un TCR de MAGEA4 y un receptor TGF β quimérico, con la estructura señalada.

Sin estar de acuerdo, pero con el fin de contribuir a dar continuidad al proceso el solicitante ha eliminado la reivindicación 13, de forma que solamente la nueva reivindicación 13 reclama una composición. La descripción, en las páginas 93 a 98, proporciona una sección sobre formulaciones y composiciones que soportan esta reivindicación. Además, las modificaciones en las reivindicaciones 1 a 12 limitan las células de dicha composición a las detalladas en la descripción.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

4. Descripción

El examinador indica que la descripción no divulga la materia reclamada de manera clara y completa para que una persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla, por lo que no cumpliría con las disposiciones del Art. 28 de la Decisión Andina 486.

En este sentido, el examinador señala que no existe divulgación suficiente para referirse a la célula que comprende un TCR de MAGEA4 y un receptor TGF β quimérico con la estructura reclamada en el capítulo reivindicatorio, ya que la descripción únicamente se refiere a células mononucleares de sangre periférica que fueron transducidas con un TCR de MAGEA4 (p. ej., SEQ ID NO: 1 y 2), o (ii) un TCR de MAGEA4 y un convertidor de señal de TGF β quimérico que responde a IL-12 (CTBR12), p. ej., SEQ ID NO: 5 (Pág. 107, Ej. 1) y un TCR de MAGEA4 (eTCR), (p. ej., SEQ ID NO: 3 y 4), o (ii) un eTCR de MAGEA4 y un receptor de CTBR12 (p. ej., SEQ ID NO: 5).

Además, el examinador considera que la descripción no divulga suficientemente la obtención de cualquier composición o de una composición farmacéutica que comprenda una célula que contiene un TCR de MAGEA4 y un receptor TGF β quimérico.

Finalmente, el examinador señala que la descripción no es clara porque refiere la misma secuencia para estructuras diferentes, por lo que no es claro cuáles son las secuencias

empleadas en los ejemplos. En el ejemplo 3 menciona que el CTBR12 comprende la SEQ ID NO: 5, pero en la Pág. 21 señala que esta corresponde a la aTCR de unión a MAGEA4. Lo mismo ocurre con las SEQ ID NO: 3 y 4, por lo que sugiere hacer las aclaraciones pertinentes.

De acuerdo con la sugerencia del examinador, el solicitante ha modificado el capítulo descriptivo para corregir los errores en los identificadores de las secuencias señalados por el examinador. Específicamente, se ha reemplazado la SEQ ID de la cadena alfa y de la cadena beta del TCR de MAGEA4 para indicar que este TCR comprende las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 (pág. 18, l.11 – 12), o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 (pág. 18, l. 14-15), respectivamente. Por lo tanto, al revisar la descripción, una persona experta en la materia entendería el alcance de las reivindicaciones a la vista de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6 (refiriéndose al TCR α de MAGEA4, TCR β MAGEA4, eTCR α de MAGEA4, y eTCR β de MAGEA4, respectivamente). Estas modificaciones están soportadas en la *Breve Descripción de los Identificadores de Secuencia* en la página 21 y en el listado de secuencias tal y como se presentó con la solicitud.

Asimismo, en el ejemplo 1, se ha aclarado que la secuencia de TCR de MAGEA4 es SEQ ID NO: 4, y del TCR de MAGEA4 y un convertidor de señal de TGF β quimérico que responde a IL-12 (CTBR12) es SEQ ID NO: 4 y 8. Finalmente, en el ejemplo 3, se ha aclarado que la secuencia del eTCR de MAGEA4 corresponde a la SEQ ID NO: 7 y para un eTCR de MAGEA4 y un receptor de CTBR12, es la SEQ ID NO: 7 y 8. Estas modificaciones están de acuerdo con la *Breve Descripción de los Identificadores de Secuencia* en la página 21, así como en la *Breve Descripción de Varias Vistas de las Figuras*, tal y como se presentó con la solicitud.

Finalmente, el solicitante manifiesta que, al considerar las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio, la descripción proporciona la información suficiente para la obtención de una composición farmacéutica que comprenda una célula que comprende un polinucleótido policistrónico que codifica un TCR de MAGEA4, cuya secuencia está descrita en la reivindicación 1.

De esta manera, la materia divulgada en la descripción ahora se relaciona de una manera más cercana con la materia definida en el capítulo reivindicatorio. Por lo tanto, la descripción proporciona toda la información necesaria para llevar a cabo la invención y cumple con los requisitos legales establecidos en la Decisión Andina 486.

5. Nivel inventivo

El examinador ha indicado que el capítulo reivindicatorio carece de nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento D2 (WO2017158103) y D3 (WO2018094244).

Con respecto a lo anterior, me permito resaltar las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que establecen que *“se considerará que la invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. Por el contrario, el análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta **no** contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

El análisis del examinador

El examinador señala que el documento D2 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, ya que divulga una célula huésped que comprende un TCR de MAGEA4 dirigido al péptido MAG-003, epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A*020i de MAGEA4 que comprende una cadena alfa establecida en SEQ ID NO: 55 y una cadena beta establecida en SEQ ID NO: 63. Además, se refiere a metodologías para obtener células T que expresan TCR dirigidos a MAGEA4 (Ejs. 1-7), en concreto se refiere a la obtención de tres TCR

(R20P1H7, R7P1D5 y R10P2G12) en donde cada uno comprende cadenas TCR-alfa y TCR-beta específicas para tumores que expresan MAGE-A4+ (Ej. 3, Tabla 2).

Ahora, es importante resaltar que el examinador reconoció que la principal diferencia entre la reivindicación 2 y la célula modificada divulgada en el documento D2, consiste en que el TCR de MAGEA4 comprende una cadena alfa, que comprende una SEQ ID NO: 2 o 5 y una cadena beta que comprende una SEQ ID NO: 3 o 6 y en que el receptor TGFβ quimérico comprende la SEQ ID NO: 8.

Sin embargo, el examinador considera que tal diferencia no está asociada a un efecto técnico, ya que la inducción de IFNγ ya había sido prevista D2, que enseña la respuesta efectora de células T transducidas con TCR R7P1D5 mediante la inducción de la producción de IFNγ tras cocultivo de la línea celular tumoral A375 que expresa MAGEA4 (Fig. 15A) y la respuesta citotóxica de células T transducidas con R7P1D5 TCR, donde se muestra la eliminación específica de antígenos de dianas tumorales que expresan MAGEA4 (A375) y MAGEA4-negativas (MCF-7) en una proporción E:T de 40:1 (Fig. 16C), por lo cual no es posible atribuirle un efecto técnico a un alcance de la invención.

Por lo tanto, el examinador considera que el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar la célula conocida en D2 con el fin de proporcionar otra célula modificada alternativa? Sin embargo, se señala que incluir un receptor TGFβ quimérico que comprende un dominio de señalización intracelular, ya está divulgado en D3, que divulga una célula modificada que comprende un receptor TGFβ quimérico o CTBR que contiene la SEQ ID NO: 28, en donde dicha secuencia polipeptídica comprende un dominio extracelular de TGFβR2 humano y un dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ2 humana, una secuencia de escisión polipeptídica y un dominio extracelular de TGFβR1 humano y el dominio transmembrana e intracelular de IL-12Rβ1 humana (Pág. 4, Líneas [1-2], Pág. 171, Reiv. 117, Pág. 24, SEQ ID NO: 28). Dicha secuencia divulgada en el documento D3 presenta 100% de identidad y cobertura con la SEQ ID NO: 8 de la solicitud. Por lo tanto, el examinador considera que la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir la SEQ ID NO: 28 del D3 en la célula de D2, haciendo que la materia reclamada fuese obvia.

La materia reclamada es inventiva a la luz del arte previo citado

En este sentido, me permito manifestar mi desacuerdo con la opinión del examinador.

Sin aceptar esta objeción, el solicitante considera que las modificaciones realizadas a las reivindicaciones hacen que dicha objeción se pueda considerar superada, Específicamente, la reivindicación 1 ahora reclama "una célula que comprende un polinucleótido policistrónico que codifica", además de limitar el TCR de MAGEA4 para que comprenda la cadena alfa de SEQ ID NO: 2 o 5 y la cadena beta de SEQ ID NO: 3 o 6. Ni D2 ni D3 enseñan o divulgan las secuencias TCR de MAGEA4 reivindicadas.

Por otra parte, el solicitante indica que se descubrió un efecto antitumoral sinérgico sorprendente de las células que comprenden el TCR de MAGEA4 y el polipéptido de fusión CTBR12 reivindicados. Como se explica en la descripción, las células tumorales y los linfocitos infiltrantes de tumores pueden sobreproducir TGF β para inhibir la función de las células T para promover un entorno inmunosupresor (pág. 22). El Solicitante demostró que, cuando las células que expresan MAGEA4 TCR/CTBR12 se cultivan con células tumorales MAGEA4+ con o sin TGF β , hubo un aumento de la secreción de IFN γ en comparación con las células que expresan el TCR MAGEA4 solo (Ejemplo 3, Figura 5), ya que las células fueron capaces de convertir una señal TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora. Estos datos demuestran que la expresión del TCR MAGEA4/CTBR12 promueve una función efectora mejorada de las células contra tumores MAGEA4+. Como el TCR de MAGEA4 reivindicado no se enseñó ni divulgó en D2 o D3, y el Solicitante descubrió un sorprendente efecto antitumoral sinérgico, no habría sido obvio para una persona experta en la materia, en vista de la técnica citada, generar una célula que exprese el TCR de MAGEA4 reivindicado y el polipéptido de fusión CTBR12.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, queda claro que las características técnicas de la materia definida en el capítulo reivindicatorio presentado junto al presente memorial no se derivan de manera obvia o evidente de las enseñanzas de D2 y D3. Por

lo tanto, el objeto reclamado cumple con el requisito de Nivel inventivo establecido en el Art. 18 de la Decisión 486.

6. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;
- ii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;
- iii) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

7. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por trece (13) reivindicaciones.
- Capítulo descriptivo modificado.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones a las reivindicaciones.

Señora Directora,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

2021/43109 (NC2021/0016480)

Reivindicaciones modificadas en respuesta a Oficio No. 3035

Julio 16, 2025

REIVINDICACIONES

1. Una célula que comprende un polinucleótido policistrónico que codifica un TCR de MAGEA4 y un polinucleótido policistrónico que codifica un convertidor de señal TGF β quimérico que responde a IL-12, en el que el TCR MAGEA4 comprende una cadena alfa que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2 y una cadena beta que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3, o una cadena alfa que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5 y una cadena beta que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 6, y en el que el convertidor de señal TGF β quimérico que responde a IL-12 comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8.

2. La célula de la reivindicación 1, en donde la cadena alfa comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 2 y la cadena beta que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 3.

3. La célula de la reivindicación 1, en donde el TCR de MAGEA4 es un polipéptido de fusión que comprende la cadena alfa y la cadena beta, en el que el polipéptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

4. La célula de la reivindicación 1, en donde la cadena alfa comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5 y la cadena beta comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 6.

5. La célula de la reivindicación 4, en donde el TCR de MAGEA4 es un polipéptido de fusión que comprende la cadena alfa y la cadena beta, en el que el polipéptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

6. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula es una célula hematopoyética.

7. La célula de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula es una célula T.

8. La célula de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula es una célula CD3⁺, CD4⁺, y/o CD8⁺.

9. La célula de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula es una célula inmunitaria efectora.

10. La célula de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula es un linfocito T citotóxico (CTL), un linfocito infiltrante tumoral (TIL), o una célula T cooperadora.

11. La célula de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula es una célula citolítica natural (NK) o célula T citolítica natural (NKT).

12. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente de la célula son las células mononucleares de sangre periférica, la médula ósea, el tejido de

ganglios linfáticos, la sangre de cordón umbilical, el tejido del timo, el tejido de un sitio de infección, ascitis, el derrame pleural, el tejido de bazo, o los tumores.

13. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

CÉLULAS T GENOMODIFICADAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio en virtud del art. 119(e) del título 35 del Código de los Estados Unidos de América de la solicitud provisional núm. 62/845,311, presentada el 8 de mayo de 2019, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN RELACIONADA CON EL LISTADO DE SECUENCIAS

El Listado de secuencias asociado con esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia impresa y se incorpora de este modo como referencia en la memoria descriptiva. El nombre del archivo de texto que contiene el Listado de secuencias es BLBD_122_01WO_ST25. El archivo de texto es de 37 KB, se creó el 6 de mayo de 2020 y se emitió electrónicamente a través de EFS-Web, junto con la presentación de la memoria descriptiva.

ANTECEDENTES

Campo técnico

La presente descripción se refiere a terapias celulares adoptivas mejoradas. Más particularmente, la descripción se refiere a moléculas de señalización mejoradas, células, y métodos para usar las mismas.

BREVE COMPENDIO

La presente descripción generalmente se refiere, en parte, a inmunoterapias adoptivas mejoradas, y en modalidades particulares, células inmunitarias efectoras que comprenden: un

polinucleótido que codifica un $\alpha\beta$ TCR que se une a MAGEA4, preferentemente un $\alpha\beta$ TCR mejorado por emparejamiento humano que se une a MAGEA4, preferentemente el péptido MAGEA4 GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 1) presentado por la molécula codificada HLA-A*02:01; y un receptor TGF β quimérico (CTBR), composiciones y métodos para usar las mismas.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un $\alpha\beta$ TCR genomodificado que se une a MAGEA4 (TCR de MAGEA4); y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β 2, un dominio transmembrana; y un dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario; una señal de escisión de polipéptido; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β 1; un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un $\alpha\beta$ TCR mejorado por emparejamiento humano que se une a MAGEA4 (MAGEA4 de eTCR); y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β 2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β 1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido se aísla de un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, o un receptor de tipo toll.

En determinadas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido se aísla de un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, o un receptor de tipo toll.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 2 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 1.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12R β 2.

En modalidades adicionales, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12R β 1.

En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 1 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 2.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12R β 1.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12R β 2.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-7R α y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ .

En modalidades adicionales, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-7R α .

En modalidades adicionales, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2R γ .

En varias modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ y el dominio de

señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-7R α .

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2R γ .

En modalidades particulares, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-7R α .

En determinadas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2R β y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ .

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2R β .

En modalidades adicionales, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2R γ .

En determinadas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2R β .

En modalidades particulares, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2R γ .

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2R β .

En modalidades adicionales, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-21R y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ .

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-21R.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2Ry.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En modalidades adicionales, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2Ry.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-21R.

En modalidades adicionales, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-18R1 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-18R1.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-18RAP.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-18R1.

En modalidades particulares, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-18RAP.

En modalidades adicionales, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-18R1.

En determinadas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1R1 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1R1.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1RAP.

En varias modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1R1.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1RAP.

En modalidades particulares el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1R1.

En determinadas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1RL2.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1RAP.

En modalidades adicionales, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1RL2.

En modalidades adicionales, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1RL2 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1RL2.

En modalidades particulares el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1RAP.

En modalidades adicionales, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IFNAR1 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IFNAR2.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IFNAR1.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IFNAR2.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IFNAR2 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de IFNAR1.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de IFNAR2.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de IFNAR1.

En modalidades adicionales, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR1 y el

dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR1.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR1.

En modalidades particulares el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR1.

En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de de TLR2 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR2.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR2.

En modalidades adicionales el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR2.

En varias modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR3 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR3.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR3.

En modalidades particulares el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR3.

En modalidades adicionales, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR4 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR4.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR4.

En algunas modalidades el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR4.

En varias modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR5 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR5.

En modalidades particulares el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR5.

En modalidades adicionales el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR5.

En varias modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR6 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR6.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR6.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR6.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR7 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR7.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR7.

En algunas modalidades el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR7.

En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR8 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR8.

En modalidades adicionales el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR8.

En varias modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR8.

En modalidades particulares, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR9 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR9.

En modalidades particulares el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR9.

En determinadas modalidades, el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR9.

En varias modalidades, el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del primer polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR10 y el dominio de señalización intracelular de receptor inmunitario del segundo polipéptido es un dominio de señalización intracelular de TLR10.

En algunas modalidades, el dominio transmembrana del primer polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR10.

En modalidades particulares el dominio transmembrana del segundo polipéptido comprende un dominio transmembrana de TLR10.

En determinadas modalidades, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico.

En varias modalidades, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido 2A autoescindible vírico.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de theilovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis.

En varias modalidades, el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-12R β 2; y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 2; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-12R β 1, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 1.

En modalidades particulares, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-12R β 1; y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 1; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-12R β 2, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 2.

En determinadas modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-7R α ; y un dominio de señalización intracelular de IL-7R α ; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana de IL-2R γ , y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ .

En algunas modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-2R γ ; y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-7R α , y un dominio de señalización intracelular de IL-7R α .

En modalidades adicionales, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-2R β ; y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β ; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana de IL-2R γ , y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ .

En modalidades adicionales, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-2R γ ; y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un

dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-2R β , y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β .

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-21R; y un dominio de señalización intracelular de IL-21R; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-2R γ , y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ .

En determinadas modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-2R γ ; y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-21R, y un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En modalidades particulares, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-18R1; y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-18RAP, y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular

de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-18RAP; y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-18R1, y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-1R1; y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-1RAP, y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP.

En modalidades adicionales, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IL-1RAP; y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IL-1R1, y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1.

En algunas modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de IFNAR1; y un dominio de señalización intracelular de IFNAR1; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana IFNAR2, y un dominio de señalización intracelular de IFNAR2.

En algunas modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana de IFNAR2; y un dominio de señalización intracelular de IFNAR2; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1; un dominio transmembrana IFNAR1 , y un dominio de señalización intracelular de IFNAR1.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana de TLR1; y un dominio de señalización intracelular de TLR1; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1; un dominio transmembrana TLR1, y un dominio de señalización intracelular de TLR1.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana de TLR2; y un dominio de señalización intracelular de TLR2; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1; un dominio transmembrana TLR2, y un dominio de señalización intracelular de TLR2.

En modalidades adicionales, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana de TLR3; y un dominio de señalización intracelular de TLR3; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio

de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1; un dominio transmembrana TLR3, y un dominio de señalización intracelular de TLR3.

En determinadas modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana de TLR4; y un dominio de señalización intracelular de TLR4; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1; un dominio transmembrana TLR4, y un dominio de señalización intracelular de TLR4.

En modalidades particulares, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana de TLR5; y un dominio de señalización intracelular de TLR5; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1; un dominio transmembrana TLR5, y un dominio de señalización intracelular de TLR5.

En algunas modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana TLR6; y un dominio de señalización intracelular de TLR6; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGFβR1 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1; un dominio transmembrana TLR6, y un dominio de señalización intracelular de TLR6.

En modalidades adicionales, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGFβR2 que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular

de TGF β R2, un dominio transmembrana TLR7; y un dominio de señalización intracelular de TLR7; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana TLR7, y un dominio de señalización intracelular de TLR7.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de TLR8; y un dominio de señalización intracelular de TLR8; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana TLR8, y un dominio de señalización intracelular de TLR8.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de TLR9; y un dominio de señalización intracelular de TLR9; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana TLR9, y un dominio de señalización intracelular de TLR9.

En varias modalidades, una célula comprende un primer polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4; y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que comprende: un polipéptido TGF β R2 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana de TLR10; y un dominio de señalización intracelular de TLR10; un péptido 2A autoescindible vírico; y un polipéptido TGF β R1 que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1; un dominio transmembrana TLR10, y un dominio de señalización intracelular de TLR10.

En modalidades particulares, el polipéptido 2A autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de theilovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis.

En varias modalidades, el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5.

En modalidades adicionales, el TCR de MAGEA4 se une al péptido GGYDGREHTV presentado por la molécula codificada HLA-A*02:01.

En algunas modalidades, el TCR de MAGEA4 comprende una cadena alfa que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 2 y una cadena beta que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 3.

En varias modalidades, el TCR de MAGEA4 comprende una cadena alfa que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena beta que comprende una secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 6.

En modalidades particulares, la célula es una célula hematopoyética.

En modalidades adicionales, la célula es una célula T.

En determinadas modalidades, la célula es una célula CD3+, CD4+, y/o CD8+.

En varias modalidades, la célula es una célula inmunitaria efectora.

En algunas modalidades, la célula es un linfocito T citotóxico (CTL), un linfocito infiltrante tumoral (TIL), o una célula T cooperadora.

En determinadas modalidades, la célula es una célula citolítica natural (NK) o célula T citolítica natural (NKT).

En modalidades particulares, la fuente de la célula son las células mononucleares de sangre periférica, la médula ósea, el tejido de ganglios linfáticos, la sangre del cordón umbilical,

el tejido del timo, el tejido de un sitio de infección, la ascitis, el derrame pleural, el tejido del bazo, o tumores.

En varias modalidades, una composición comprende una célula que expresa un TCR de MAGEA4 y un polipéptido de fusión contemplado en la presente descripción.

En modalidades adicionales, una composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una célula que expresa un TCR de MAGEA4 y un polipéptido de fusión contemplado en la presente descripción.

En determinadas modalidades, a método para tratar a un sujeto que lo necesita comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición contemplada en la presente descripción.

En varias modalidades, un método para tratar, prevenir, o mejorar al menos un síntoma de un cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, e inmunodeficiencia, o afección asociada con estos, comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición contemplada en la presente descripción.

En modalidades particulares, un método para tratar un cáncer sólido comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición contemplada en la presente descripción.

En algunas modalidades, el cáncer sólido comprende cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, sarcoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hueso, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, o cáncer de piel.

En determinadas modalidades, el cáncer sólido es un cáncer pancreático, un cáncer de pulmón, o un cáncer de mama.

En modalidades particulares, un método para tratar una neoplasia maligna hematológica comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición contemplada en la presente descripción.

En varias modalidades, la neoplasia maligna hematológica es una leucemia, linfoma, o mieloma múltiple.

BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la fosforilación de STAT4 y SMAD2/3 en células T no transducidas (UTD), células T transducidas con un LVV que codifica un TCR de MAGEA4, y en células T transducidas con un LVV que codifica un TCR de MAGEA4 y un LVV que codifica un receptor TGF β 1 quimérico (CTBR12) que responde a IL-12 cultivado en presencia o ausencia de TGF β 1 durante 20 minutos.

La Figura 2 muestra la secreción de IFN γ de células T UTD, células T con TCR de MAGEA4, y células T con TCR/CTBR12 MAGEA4 cultivadas solas o cultivadas con células tumorales A375 MAGEA4⁺ en una relación E:T de 1:1 durante 24 horas en presencia o ausencia de TGF β 1 (10 ng/ml).

La Figura 3 muestra el volumen de células tumorales A375 MAGEA4⁺ en un modelo de ratón con xenoinjerto de tumor NSG tratado con células T UTD, células T con TCR de MAGEA4, o células T con TCR/CTBR12 MAGEA4.

La Figura 4 muestra la fosforilación de STAT4 y SMAD2/3 en células T transducidas con un LVV que codifica un TCR mejorado por emparejamiento (eTCR) de MAGEA4, y en células T transducidas con un LVV que codifica un eTCR de MAGEA4 y un receptor TGF β 1 quimérico (CTBR12) que responde a IL-12 cultivado en presencia o ausencia de TGF β 1 durante 20 minutos.

La Figura 5 muestra la secreción de IFN γ de células T UTD, células T con eTCR de MAGEA4, y células T con eTCR/CTBR12 de MAGEA4 cultivadas con TGF β 1 o cultivadas con células tumorales A375 MAGEA4⁺ en una relación E:T de 1:1 durante 24 horas en presencia o ausencia de TGF β 1 (10 ng/ml).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IDENTIFICADORES DE SECUENCIA

La SEQ ID NO: 1 expone la secuencia de aminoácidos de un epítipo de MAGEA4.

La SEQ ID NO: 2 expone la secuencia de aminoácidos de la cadena TCR α de MAGEA4 humana.

La SEQ ID NO: 3 expone la secuencia de aminoácidos de la cadena TCR β de MAGEA4 humana.

La SEQ ID NO: 4 expone la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión de TCR de MAGEA4.

La SEQ ID NO: 5 expone la secuencia de aminoácidos de la cadena eTCR α de MAGEA4 humano.

La SEQ ID NO: 6 expone la secuencia de aminoácidos de la cadena eTCR β de MAGEA4 humano.

La SEQ ID NO: 7 expone la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión de eTCR de MAGEA4.

La SEQ ID NO: 8 expone la secuencia de aminoácidos de un receptor TGF β quimérico (CTBR12) que responde a IL-12.

Las SEQ ID NO: 9-19 exponen las secuencias de aminoácidos de varios enlazadores.

Las SEQ ID NO: 20-44 exponen las secuencias de aminoácidos de los sitios de escisión de proteasa y los sitios de escisión de polipéptidos autoescindibles.

La SEQ ID NO: 45 expone la secuencia de nucleótidos de una secuencia Kozak.

En las secuencias anteriores, X, si está presente, se refiere a cualquier aminoácido o a la ausencia de un aminoácido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A. SUMARIO

Las células T que expresan el receptor de células T (TCR) han demostrado una eficacia limitada, si la hubiera, en indicaciones de tumor sólido, en parte debido al microambiente de tumor (TME) sólido inmunosupresor. La sobreproducción de citocinas inmunosupresoras, incluido el TGF β , por las células tumorales y los linfocitos infiltrantes tumorales contribuyen a un microambiente tumoral inmunosupresor. El TGF β inhibe la función de las células T a través de una variedad de mecanismos. El TGF β se asocia frecuentemente con la invasión y la metástasis tumoral, lo que inhibe la función de las células inmunitarias y el pronóstico reservado en pacientes con cáncer. La señalización del TGF β a través del TGF β R2 en CTL específicos del tumor disminuye su función y frecuencia en el tumor, y el bloqueo de la señalización del TGF β en células T CD8⁺ con anticuerpos monoclonales da como resultado una vigilancia más rápida del tumor y la presencia de muchos más CTL en el sitio del tumor. Hasta la fecha, las estrategias para inhibir el TGF β en un entorno clínico no han resultado en beneficios terapéuticos significativos.

La presente descripción generalmente se refiere a células efectoras inmunitarias que expresan TCR de MAGEA4 y polipéptidos que convierten una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora y a células que expresan los polipéptidos. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, los polipéptidos contemplados en la presente descripción son receptores TGF β quiméricos (CTBR) que comprenden los dominios de unión a TGF β de TGF β R1 y TGF β R2, que cuando se unen a endominios inmunoestimuladores y se coexpresan en células efectoras inmunitarias, pueden convertir la exposición de TGF β de una señal inmunosupresora a una inmunoestimuladora que estimula la actividad y función de la célula inmunoestimuladora efectora. La coexpresión de polipéptidos de receptor de TGF β quimérico en células inmunitarias efectoras hace que las células sean resistentes a los impactos

inmunosupresores de TGF β , p. ej., al restaurar o aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias. En modalidades preferidas particulares, el TCR de MAGEA4 es un TCR mejorado (eTCR) por emparejamiento de MAGEA4 humano y el receptor de TGF β quimérico es CTBR12.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 y polipéptidos CTBR que convierten una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 y polipéptidos CTBR que convierten una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de citocinas.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 y polipéptidos CTBR que convierten una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de interleucina.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 y polipéptidos CTBR que convierten una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de reconocimiento de patrones.

En varias modalidades, la presente descripción contempla, en parte, células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 y polipéptidos CTBR que convierten una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada a través de o por uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores de tipo toll.

En modalidades particulares, la presente descripción contempla, en parte, células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 y un polipéptido de CTBR que

comprende un dominio extracelular de TGF β R1 que se une a TGF β , un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios; y un polipéptido de CTBR que comprende un dominio extracelular de TGF β R2 que se une a TGF β , un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios. En una modalidad, los polipéptidos se unen entre sí mediante una señal de escisión de polipéptidos, p. ej., una señal de escisión de polipéptidos 2A.

En modalidades particulares, la presente descripción contempla, en parte, una célula inmunitaria efectora, que expresa un TCR de MAGEA4 (p. ej., SEQ ID NO: 2-4), preferentemente un TCR mejorado por emparejamiento de MAGEA4 (eTCR; p. ej., SEQ ID NO: 5-7), preferentemente un TCR mejorado por emparejamiento de MAGEA4 que se une al péptido de MAGEA4 GVYDGREHTV presentado por la molécula codificada HLA-A*02:01, y un polipéptido de fusión que codifica un receptor de TGF β quimérico (CTBR) que comprende un dominio extracelular de TGF β R1 que se une a TGF β , un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios; y un polipéptido que comprende un dominio extracelular de TGF β R2 que se une a TGF β , un dominio transmembrana y uno o más dominios intracelulares de uno o más receptores inmunitarios.

En modalidades particulares, los dominios transmembrana y dominios de señalización intracelulares se aíslan de un receptor de IL-12, un receptor de IL-7, un receptor de IL-15, un receptor de IL-21, un receptor de IL-2, un receptor de IL-1, un receptor de IL-18, un receptor de IL-36, un receptor de IFN de tipo I, un receptor de TLR1, un receptor de TLR2, un receptor de TLR3, un receptor de TLR4, un receptor de TLR5, un receptor de TLR6, un receptor de TLR7, un receptor de TLR8, un receptor de TLR9, o un receptor de TLR10.

En modalidades particulares, los dominios transmembrana y los dominios de señalización intracelulares se aíslan de IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, o TLR10.

En modalidades preferidas, el polipéptido de fusión es un CTBR que responde a IL-12 (CTBR12; p. ej., SEQ ID NO: 8).

Técnicas para ADN recombinante (es decir, genéticamente modificados), síntesis de péptidos y oligonucleótidos, inmunoensayos, cultivo de tejido, transformación (p. ej., electroporación, lipofección), reacciones enzimáticas, purificación y técnicas y procedimientos relacionados que generalmente pueden realizarse como se describe en varias referencias generales y más específicas en microbiología, biología molecular, bioquímica, genética molecular, biología celular, virología e inmunología tal como se cita y analiza en toda la presente memoria descriptiva. Véase, p. ej., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, actualizado en julio de 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I y II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); *Current Protocols in Immunology* (editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Editado por Julie Logan, Kirstin Edwards y Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid The Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH); *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H.

Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, *Essential Immunology*, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); *Current Protocols in Immunology* (Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; así como también monografías en periódicos tales como *Advances in Immunology*.

B. DEFINICIONES

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que los que comúnmente entienden los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o prueba de modalidades particulares, las modalidades preferidas de composiciones, métodos y materiales se describen en la presente descripción. A los fines de la presente descripción, los siguientes términos se definen a continuación.

Los artículos “un”, “una”, y “el/la” se usan en la presente descripción para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno, o a uno o más) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o uno o más elementos.

Debe entenderse que el uso de la alternativa (p. ej., “o”) significa una, ambas o cualquier combinación de estas alternativas.

Debe entenderse que el término “y/o” significa una o ambas alternativas.

Como se usa en la presente descripción, el término “aproximadamente” o “en aproximación” se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en tanto como 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5

%, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % hasta una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso, peso o longitud de referencia. En una modalidad, el término “aproximadamente” o “en aproximación” se refiere a un rango de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud $\pm 15 \%$, $\pm 10 \%$, $\pm 9 \%$, $\pm 8 \%$, $\pm 7 \%$, $\pm 6 \%$, $\pm 5 \%$, $\pm 4 \%$, $\pm 3 \%$, $\pm 2 \%$ o $\pm 1 \%$ aproximadamente una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso, peso o longitud de referencia.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras “comprende”, “que comprende” y “comprendiendo” implican la inclusión de un paso o elemento indicado o grupo de pasos o elementos, pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos. Por “compuesto de” se entiende lo que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase “compuesto de”. Por lo tanto, la frase “que consiste en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes. Por “consiste esencialmente en” se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que no hay otros elementos presentes que afecten materialmente la actividad o acción de los elementos enumerados.

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a “una modalidad”, “una modalidad particular”, “una modalidad relacionada”, “una modalidad determinada”, “una modalidad adicional”, u “otra modalidad” o combinaciones de estas significa que una característica, estructura o función particular descrita en relación con la modalidad se incluye en al menos una modalidad. Por lo tanto, las apariciones de las frases anteriores en varios lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma modalidad. Además, las características, estructuras o funciones particulares pueden combinarse de cualquier manera

adecuada en una o más modalidades. También se entiende que la enumeración positiva de una característica en una modalidad, sirve como base para excluir la característica en una modalidad particular.

Un “antígeno (Ag)” se refiere a un compuesto, composición, o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, que incluye composiciones (tales como una que incluye una proteína específica del cáncer) que se inyectan o absorben en un animal. Los antígenos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a lípidos, carbohidratos, polisacáridos, glucoproteínas, péptidos, o ácidos nucleicos. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, que incluye los inducidos por antígenos heterólogos, tales como los antígenos descritos.

Un “antígeno diana” o “antígeno diana de interés” es un antígeno en el que un dominio de unión contemplado en la presente descripción, se diseña para unirse. En modalidades particulares, el antígeno diana se selecciona del grupo que consiste en: receptor de folato alfa, 5T4: integrina $\alpha\beta6$, BCMA, B7-H3: B7-H6: CAIX, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD44, CD44v6; CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123 CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, familia de EGFR, incluido ErbB2 (HER2), EGFRVIII, EGP2 EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, AchR fetal, FR α , GD2 GD3 Glypican-3 (GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, Lambda, Lewis-Y, Kappa, Mesotelina, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1 SSX, Survivina, STn, TAG72, TEM, VEGFR2 y WT-1. En una modalidad preferida, el antígeno diana es MAGEA4.

MAGE-A4 pertenece al grupo de los llamados antígenos de cáncer/testículos. Los antígenos de cáncer/testículo se expresan en varios tumores malignos y células germinales, pero no en otros tejidos adultos. Por lo tanto, MAGE-A4 es un antígeno diana inmunoterapéutico interesante. El gen humano que codifica MAGE-A4 se denomina MAGEA4 (ENSG00000147381).

En una modalidad, el antígeno es un complejo de péptidos MHC, tal como un complejo de péptidos MHC de clase I o un complejo de péptidos MHC de clase II.

Un “enlazador” se refiere a una pluralidad de residuos de aminoácidos entre los diversos dominios de polipéptidos agregados para la separación y conformación adecuadas de la molécula.

Los ejemplos ilustrados de enlazadores adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a las siguientes secuencias de aminoácidos: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 9); TGEKP (SEQ ID NO: 10) (ver, *p. ej.*, Liu *et al.*, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 11) (Pomerantz *et al.* 1995, *supra*); (GGGGS)_n en donde n = 1, 2, 3, 4 o 5 (SEQ ID NO: 12) (Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 13) (Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 14) (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 15); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 16); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 17); LRQKD(GGGGS)₂ ERP (SEQ ID NO: 18). Alternativamente, los enlazadores flexibles pueden ser diseñados racionalmente usando un programa informático capaz de modelar ambos sitios de unión de ADN y los péptidos en sí mismos (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994) o por métodos de visualización de fagos. En una modalidad, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 19) (Cooper *et al.*, Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

Un “dominio transmembrana” o “dominio DT” es un dominio que ancla un polipéptido a la membrana plasmática de una célula. El dominio DT puede derivarse de una fuente natural, sintética, semisintética, o recombinante.

Un “dominio de señalización intracelular” se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función efectora y que dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque generalmente puede emplearse todo el dominio de señalización

intracelular, en muchos casos no es necesario usar todo el dominio. En la medida en que se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de todo el dominio siempre y cuando transduzca la señal de función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir una señal de función efectora.

El término “función efectora” o “función de la célula efectora” se refiere a una función especializada de una célula inmunitaria efectora. La función efectora incluye, entre otros, la activación, la producción de citocinas, la proliferación y la actividad citotóxica, incluida la liberación de factores citotóxicos, u otras respuestas celulares provocadas por la unión del antígeno al receptor expresado en la célula inmunitaria efectora.

Un “trastorno inmunitario” se refiere a una enfermedad que evoca una respuesta del sistema inmunitario. En modalidades particulares, el término “trastorno inmunitario” se refiere a un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, o una inmunodeficiencia. En una modalidad, los trastornos inmunitarios abarcan enfermedades infecciosas.

Como se usa en la presente descripción, el término “cáncer” se refiere generalmente a una clase de enfermedades o afecciones en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir tejidos cercanos.

Como se usa en la presente descripción, el término “maligno” se refiere a un cáncer en el que un grupo de células tumorales muestran uno o más de crecimiento no controlado (es decir, división más allá de los límites normales), invasión (es decir, intrusión y destrucción de tejidos adyacentes), y metástasis (es decir, diseminación a otras localizaciones en el cuerpo a través de la linfa o la sangre). Como se usa en la presente descripción, el término “metastatizar” se refiere a la propagación del cáncer de una parte del cuerpo a otra. Un tumor formado por células que se han propagado se denomina “tumor metastásico” o “metástasis”. El tumor metastásico contiene células similares a las del tumor original (primario).

Como se usa en la presente descripción, el término “benigno” o “no maligno” se refiere a tumores que pueden crecer más pero no se propagan a otras partes del cuerpo. Los tumores benignos son autolimitados y, por lo general, no invaden ni metastatizan.

Una “célula cancerosa” se refiere a una célula individual de un crecimiento o tejido canceroso. Las células cancerosas incluyen tanto cánceres sólidos como cánceres líquidos. Un “tumor” o “célula tumoral” se refiere generalmente a una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células, que puede ser benigno, premaligno o maligno. La mayoría de los cánceres forman tumores, pero los cánceres líquidos, p. ej., la leucemia, no necesariamente forman tumores. Para aquellos tipos de cáncer que forman tumores, los términos cáncer (célula) y tumor (célula) se usan indistintamente. La cantidad de un tumor en una persona es la “carga tumoral” que puede determinarse como la cantidad, el volumen o el peso del tumor.

El término “recidiva” se refiere al diagnóstico de regreso, o signos y síntomas de regreso, de un cáncer después de un período de mejoría o remisión.

“Remisión” también se denomina “remisión clínica” e incluye la remisión parcial y la remisión completa. En la remisión parcial, algunos, pero no todos, los signos y síntomas del cáncer han desaparecido. En remisión completa, todos los signos y síntomas del cáncer han desaparecido, aunque el cáncer aún puede estar en el cuerpo.

“Resistente al tratamiento” se refiere a un cáncer que es resistente o no responde a la terapia con un agente terapéutico particular. Un cáncer puede ser resistente desde el inicio del tratamiento (es decir, no responde a la exposición inicial al agente terapéutico) o como resultado de desarrollar resistencia al agente terapéutico, ya sea durante el transcurso de un primer período de tratamiento o durante un período de tratamiento posterior.

“Antígeno negativo” se refiere a una célula que no expresa antígeno o expresa una cantidad insignificante de antígeno que es indetectable. En una modalidad, las células negativas al antígeno no se unen a receptores dirigidos al antígeno. En una modalidad, las células negativas al antígeno no se unen sustancialmente a receptores dirigidos al antígeno.

Una “enfermedad autoinmunitaria” se refiere a una enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta inmunogénica (es decir, el sistema inmunitario) a algún constituyente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmunitario pierde su capacidad de reconocer algún tejido o sistema dentro del cuerpo como “propio”, y lo ataca y ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunitarias pueden clasificarse en aquellas en las que se ve afectado predominantemente un órgano (p. ej., anemia hemolítica y tiroiditis antiinmunitaria), y aquellas en las que el proceso de enfermedad autoinmunitaria se difunde a través de muchos tejidos (p. ej., lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es causada por células T que atacan las vainas que rodean las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal. Esto provoca la pérdida de la coordinación, debilidad y visión borrosa. Las enfermedades autoinmunitarias se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumática, anemia hemolítica, tiroiditis antiinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis, y similares.

Una “inmunodeficiencia” significa el estado de un paciente cuyo sistema inmunitario se ha visto comprometido por una enfermedad o por la administración de sustancias químicas. Esta afección hace que el sistema sea deficiente en la cantidad y el tipo de células sanguíneas necesarias para defenderse de una sustancia extraña. Las afecciones o enfermedades de inmunodeficiencia se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), SCID (enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave), deficiencia selectiva de IgA, inmunodeficiencia variable común, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de hiper-IgM, y diabetes.

Una “enfermedad infecciosa” se refiere a una enfermedad que puede transmitirse de persona a persona o de organismo a organismo, y es causada por un agente microbiano o vírico (p. ej., resfrío común). Las enfermedades infecciosas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo,

hepatitis, enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia, gonorrea), tuberculosis, VIH/SIDA, difteria, hepatitis B, hepatitis C, cólera, e influenza.

Como se usa en la presente descripción, los términos “individuo” y “sujeto” a menudo se usan indistintamente y se refieren a cualquier animal que exhibe un síntoma de cáncer u otro trastorno inmunitario que puede tratarse con las composiciones y métodos contemplados en otra parte en la presente descripción. Los sujetos adecuados (p. ej., pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratones, ratas, conejos o cobayos), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen pacientes humanos que tienen, han sido diagnosticados con cáncer u otro trastorno inmunitario, o están en riesgo o tienen cáncer u otro trastorno inmunitario.

Como se usa en la presente descripción, el término “paciente” se refiere a un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer u otro trastorno inmunitario que puede tratarse con las composiciones y métodos descritos en otra parte en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, “tratamiento” o “tratar”, incluye cualquier efecto beneficioso o deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se trata. El tratamiento puede implicar opcionalmente la reducción de la enfermedad o afección, o el retraso de la progresión de la enfermedad o afección, p. ej., el retraso del crecimiento del tumor. El “tratamiento” no necesariamente indica la erradicación completa o la cura de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados a esta.

Como se usa en la presente descripción, “prevenir”, y palabras similares tales como “prevenido,” “prevención”, etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir, o reducir la probabilidad de aparición o recurrencia de una enfermedad o afección. También se refiere a demorar la aparición o recurrencia de una enfermedad o afección, o a demorar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o afección. Como se usa en la presente

descripción, “prevención” y palabras similares también incluyen reducir la intensidad, efecto, síntomas y/o carga de una enfermedad o afección antes de la aparición o recurrencia de la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente descripción, la frase “mejorar al menos un síntoma de” se refiere a disminuir uno o más síntomas de la enfermedad o afección por la cual el sujeto está siendo tratado. En modalidades particulares, la enfermedad o afección que se está tratando es un cáncer, en donde el uno o más síntomas mejorados incluyen, entre otros, debilidad, fatiga, falta de aire, fácil aparición de hematomas y sangrado, infecciones frecuentes, agrandamiento de los ganglios linfáticos, abdomen distendido o doloroso (debido a agrandamiento de los órganos abdominales), dolor óseo o articular, fracturas, pérdida de peso no planificada, pérdida del apetito, sudoración nocturna, fiebre leve persistente y disminución de la orina (debido a un mal funcionamiento del riñón).

Por “mejorar” o “promover”, o “aumentar”, o “expandir”, se refiere generalmente a la capacidad de la composición contemplada en la presente para producir, provocar, o causar una respuesta fisiológica mayor (es decir, efectos posteriores) en comparación con la respuesta causada por cualquiera de los vehículos o una molécula/composición de control. Una respuesta fisiológica que puede ser determinada puede incluir un aumento en la expansión, activación, persistencia, secreción de citocinas de las células T, y/o un aumento en la capacidad de destrucción de células cancerosas, entre otros evidentes a partir de la comparación en la técnica y la presente descripción. Una cantidad “aumentada” o “incrementada” es típicamente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir un aumento que es 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (que incluye todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta producida por el vehículo o una composición de control.

Por “disminuir” o “bajar”, o “paliar”, o “reducir”, o “remitir” se refiere generalmente a la capacidad de la composición contemplada en la presente para producir, provocar, o causar una

respuesta fisiológica menor (es decir, efectos posteriores) en comparación con la respuesta causada por cualquiera de los vehículos o una molécula/composición de control. Una cantidad “disminuida” o “reducida” es típicamente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir una disminución que es 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (p. ej., 500, 1000 veces) (que incluye todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la respuesta (respuesta de referencia) producida por el vehículo, una composición de control o la respuesta en un linaje celular particular.

Por “mantener”, o “preservar”, o “mantenimiento”, o “sin cambio”, o “sin cambio sustancial”, o “sin disminución sustancial” se refiere generalmente a la capacidad de una composición contemplada en la presente descripción para producir, provocar, o causar una respuesta fisiológica sustancialmente similar o comparable (es decir, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por cualquiera de los vehículos, una composición/molécula de control o la respuesta en un linaje celular particular. Una respuesta comparable es aquella que no es significativamente diferente o de diferencia determinable de la respuesta de referencia.

C. RECEPTORES DE CÉLULAS T DE MAGEA4

Los receptores de células T (TCR) de MAGEA4 reconocen un fragmento peptídico de MAGEA4 cuando se presenta mediante una molécula de complejo de histocompatibilidad (MHC) mayor. Hay dos clases diferentes de moléculas de MHC, MHC I y MHC II, que administran péptidos de diferentes compartimentos celulares a la superficie celular. La unión del TCR con el antígeno y el MHC da como resultado la activación de las células inmunitarias efectoras a través de una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, correceptores y moléculas accesorias especializadas.

Un TCR contemplado en la presente descripción es un complejo heterodimérico que comprende una cadena alfa de TCR (TCR α) y una cadena beta de TCR (TCR β). El locus de TCR α humano se encuentra en el cromosoma 14 (14q11.2). La cadena TCR α madura comprende un dominio variable derivado de la recombinación de un segmento variable (V) y un segmento de unión (J), y un dominio constante (C). El locus de TCR β humano se encuentra en el cromosoma 7 (7q34). La cadena TCR β madura comprende un dominio variable derivado de la recombinación de un segmento variable (V), un segmento de diversidad (D), y un segmento de unión (J), y uno de dos dominios constantes (C).

En modalidades particulares, el TCR se une a MAGEA4.

En modalidades particulares, el TCR es un TCR humano que se une a MAGEA4.

En modalidades preferidas, el TCR es un TCR potenciado por emparejamiento humano que se une a MAGEA4.

Los TCR de MAGEA4 potenciados por emparejamiento contemplados en la presente descripción se modifican genéticamente para aumentar la estabilidad del TCR, la expresión del TCR, el emparejamiento específico del TCR y la aversez funcional.

En modalidades particulares, los dominios constantes de las cadenas TCR α de MAGEA4 y TCR β de MAGEA4 se modifican genéticamente para aumentar la estabilidad del TCR, la expresión del TCR, el emparejamiento específico del TCR, y la aversez funcional.

Para mejorar eficientemente el emparejamiento correcto de las secuencias de TCR de MAGEA4 y evitar el mal emparejamiento con cadenas de TCR endógenas, los TCR mejorados por emparejamiento de MAGEA4 contemplados en la presente descripción comprenden dominios constantes de TCR α y TCR β mínimamente murinizados y comprenden además sustituciones de aminoácidos hidrófobos en el dominio transmembrana de TCR α .

En modalidades preferidas, un TCR mejorado (eTCR) por emparejamiento de MAGEA4 comprende una cadena TCR α de MAGEA4 que comprende un dominio constante que comprende sustituciones de aminoácidos de murinización mínimas en las posiciones 90, 91, 92, y 93, y

sustituciones de aminoácidos hidrófobos en las posiciones 115, 118 y 119 de la región constante; y una cadena TCR β de MAGEA4 que comprende un dominio constante que comprende sustituciones de aminoácidos de murinización mínima en las posiciones 18, 22, 133, 136, y 139.

En modalidades preferidas, un eTCR de MAGEA4 comprende una cadena TCR α que comprende un dominio constante que comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos de murinización mínima P90S, E91D, S92V, y S93P y las siguientes sustituciones de aminoácidos hidrófobos en el dominio transmembrana de la región constante; S115L, G118V, y F119L y una cadena TCR β que comprende un dominio constante que comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos de murinización mínima, E18K, S22A, F133I, E/V136A, y Q139H.

En modalidades preferidas particulares, un eTCR de MAGEA4 comprende una cadena TCR α que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena TCR β que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 6. En otras modalidades preferidas particulares, el eTCR de MAGEA4 se expresa como un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 7.

D. RECEPTOR DE TGF β QUIMÉRICO (CTBR)

En modalidades particulares, se contempla una célula que comprende un polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4 humano o un TCR mejorado (eTCR) por emparejamiento de MAGEA4 humano y un receptor TGF β quimérico que transduce una señal inmunoestimuladora tras la exposición a TGF β , que incluye pero no se limita a TGF β 1.

Como se usa en la presente descripción, el término “receptor de TGF β quimérico” se refiere a uno o más polipéptidos de origen no natural que convierten las señales inmunosupresoras de TGF β del microambiente tumoral en señales inmunoestimuladoras en una célula T, p. ej., estimulando la actividad y función de las células inmunitarias efectoras, aumentando la producción y/o secreción de citocinas proinflamatorias. En modalidades

particulares, el término “receptor TGF β quimérico” se usa indistintamente con el término “CTBR”.

En modalidades particulares, el polipéptido CTBR comprende un dominio de unión a TGF β extracelular del TGF β R2, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero no se limita a un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo Toll; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero no se limita a un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo Toll.

En modalidades particulares, el CTBR es un polipéptido de fusión que comprende un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β extracelular del TGF β R2, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero no se limita a un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo Toll; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β extracelular del TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero no se limita a un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo Toll.

En otras modalidades particulares, el CTBR es un complejo de polipéptidos que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β extracelular del TGF β R2, un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero no se limita a un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo Toll; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de un receptor inmunitario que incluye, pero no se limita

a un receptor de citocina, un receptor de interleucina, un receptor de reconocimiento de patrones, y un receptor de tipo Toll.

Como se usa en la presente descripción, el término “receptor inmunitario” se refiere a un receptor que se expresa en la superficie de una célula inmunitaria que modula una respuesta inmunitaria al unirse a su ligando cognado. Los receptores inmunitarios adecuados para su uso en modalidades particulares incluyen, pero no se limitan a: receptores de citocina, receptores de interleucina, receptores de reconocimiento de patrones, y receptores de tipo toll, en donde la señalización a través del receptor inmunitario estimula una respuesta inmunitaria.

Ejemplos ilustrativos de dominios de señalización intracelular y transmembrana de receptores inmunitarios que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen pero no se limitan a dominios de señalización intracelular y transmembrana aislados de un receptor de IL-12, un receptor de IL-7, un receptor de IL-15, un receptor de IL-21, un receptor de IL-2, un receptor de IL-1, un receptor de IL-18, un receptor de IL-36, un receptor de IFN de tipo I, un receptor de TLR1, un receptor de TLR2, un receptor de TLR3, un receptor de TLR4, un receptor de TLR5, un receptor de TLR6, un receptor de TLR7, un receptor de TLR8, un receptor de TLR9, o un receptor de TLR10.

Ejemplos ilustrativos adicionales de dominios de señalización intracelular y transmembrana de receptores inmunitarios que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a dominios de señalización intracelular y transmembrana aislados de IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, IL-1RL2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, o TLR10.

Ejemplos ilustrativos de dominios de señalización intracelular y transmembrana de receptores de citosina que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a dominios de señalización intracelular y

transmembrana aislados de IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, IFNAR1, IFNAR2, e IL-1RL2.

Ejemplos ilustrativos de dominios de señalización intracelular y transmembrana de receptores de interleucina que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a dominios de señalización intracelular y transmembrana aislados de IL-12R β 2, IL-7R α , IL-2R γ , IL-2R β , IL-21R, IL-18R1, IL-18RAP, IL-1R1, IL-1RAP, e IL-1RL2.

Los ejemplos ilustrativos de dominios de señalización intracelular y transmembrana de receptores tipo toll que pueden usarse en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a dominios de señalización intracelular y transmembrana aislados de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, y TLR10.

1. *POLIPÉPTIDOS CTBR12*

La Interleucina-12 (IL-12) es una citocina que promueve la actividad y la función de las células T mediante, en parte, el aumento de la expresión de IFN γ , el aumento de la proliferación de células T y la potenciación de la señalización de la IL-12. La IL-12 se une al receptor de interleucina 12, beta 1 (IL-12R β 1, también conocido como CD212) y al receptor de interleucina 12, beta 2 (IL-12R β 2).

La señalización de IL-12 a través de IL-12R β 1 e IL-12R β 2 da como resultado la fosforilación de STAT3, STAT4 y STAT5. STAT3/STAT4 fosforilado se traslada al núcleo y se une al promotor de IFN γ para aumentar la expresión de IFN γ . STAT4 fosforilado también recluta el oncogén Jun (c-Jun) al promotor de IFN γ para aumentar la expresión de IFN γ y potencia la señalización de IL-12 al aumentar la transcripción de IL-12R β 2. La fosforilación de STAT5 aumenta la proliferación de células T.

La señalización de IL-12 también aumenta la expresión del receptor de interleucina 2, alfa (IL-2R) mediante el reclutamiento de STAT4 y c-Jun al promotor de IL-2R, mejorando así la proliferación de células T.

En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras, que incluyen células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican uno o más polipéptidos CTBR12. En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un CTBR12 y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 .

En modalidades particulares, el CTBR12 convierte una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-12. En modalidades particulares, un CTBR12 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 1; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 2. En modalidades particulares, un CTBR12 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 2; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 1.

En modalidades particulares, un CTBR12 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 1; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12R β 2. En modalidades

particulares, un CTBR12 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ2; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ1.

En modalidades particulares, el CTBR12 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ1; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ2. En modalidades particulares, el CTBR12 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ2; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-12Rβ1.

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGFβR1 o TGFβR2. En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-12Rβ1 o IL-12Rβ2. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1 y un dominio transmembrana de IL-12Rβ1 y dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2 y un dominio transmembrana de IL-12Rβ2 y dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1 y un dominio transmembrana de IL-12Rβ2 y dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a

TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana de IL-12R β 1 y dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico; más preferentemente, un polipéptido 2A autoescindible vírico; y con mayor preferencia un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de teiovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico P2A o T2A.

2. *POLIPÉPTIDOS CTBR7*

La interleucina-7 (IL-7) es una citocina que promueve la actividad y la función de las células T al mejorar, en parte, la supervivencia y la proliferación de los precursores de células T. La IL-7 se une al receptor alfa de interleucina 7 (IL-7R α , también conocido como CD127) y al receptor de interleucina 2, cadena gamma común (IL-2R γ , también conocida como CD132 y γ c). La señalización de la IL-7 activa las vías de la cinasa JAK/STAT, PI-3K y Src, y da como resultado la transcripción de genes antiapoptóticos y genes que promueven la proliferación de precursores de células T.

En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras, que incluyen células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican uno o más polipéptidos CTBR7. En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un CTBR7 y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 .

En modalidades particulares, el receptor TGF β quimérico convierte una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-7. En modalidades particulares, un CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-7R α ; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades particulares, un CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-7R α .

En modalidades particulares, un CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-7R α ; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades particulares, un CTBR7 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-7R α .

En modalidades particulares, el CTBR7 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización

intracelular de IL-7R α ; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades particulares, el CTBR7 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-7R α .

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF β R1 o TGF β R2. En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-7R α o IL-2R γ . En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1 y un dominio transmembrana IL-7R α y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana IL-2R γ y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1 y un dominio transmembrana IL-2R γ y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana IL-7R α y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico; más preferentemente, un polipéptido 2A autoescindible vírico; y con mayor preferencia un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de teiovirus, y un péptido 2A del virus de

encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico P2A o T2A.

3. *POLIPÉPTIDOS CTBR15*

La interleucina-15 (IL-15) es una citocina que promueve la actividad y la función de las células T al mejorar, en parte, la supervivencia y la proliferación de los precursores de células T. La IL-15 se une con alta afinidad a IL-15R α (también conocido como CD215), que luego se asocia con un complejo que comprende IL-2R β (también conocido como IL-15R β y CD122) e IL-2R γ (también conocido como CD132 y γ_c), expresado ya sea en la misma célula (presentación cis) o en una célula diferente (presentación trans). La señalización de la IL-15 activa las vías de la cinasa JAK/STAT, PI-3K y Src, y da como resultado la transcripción de genes antiapoptóticos y genes que promueven la proliferación de precursores de células T.

En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras, que incluyen células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican uno o más polipéptidos CTBR15, y opcionalmente, un polinucleótido o vector que codifica un IL-15R α . En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un CTBR15 y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4, y opcionalmente, un polinucleótido o vector que codifica un polipéptido IL-15R α .

En modalidades particulares, el receptor TGF β quimérico convierte una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-15. En modalidades particulares, un CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β ; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de

señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades particulares, un CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β .

En modalidades particulares, un CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β ; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades particulares, un CTBR15 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β .

En modalidades particulares, el CTBR15 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β ; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades particulares, el CTBR15 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a

TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R β .

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF β R1 o TGF β R2. En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-2R β o IL-2R γ . En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1 y un dominio transmembrana IL-2R β y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana IL-2R γ y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1 y un dominio transmembrana IL-2R γ y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana de IL-2R β y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico; más preferentemente, un polipéptido 2A autoescindible vírico; y con mayor preferencia un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de teiovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico P2A o T2A.

4. *POLIPÉPTIDOS CTBR21*

La interleucina-21 (IL-21) es una citocina que promueve la actividad y la función de las células T al mejorar, en parte, la supervivencia y la proliferación de los precursores de células T. La IL-21 se une al receptor 21 de interleucina (IL-21R, también conocido como CD360) e IL-2R γ

(también conocido como CD132 y γ_c). La señalización de la IL-21 activa las vías de la cinasa JAK/STAT, PI-3K y Src, y da como resultado la transcripción de genes antiapoptóticos y genes que promueven la proliferación de precursores de células T.

En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras, que incluyen células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican uno o más polipéptidos CTBR21. En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un CTBR21 y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4.

En modalidades particulares, el receptor $TGF\beta$ quimérico convierte una señal de $TGF\beta$ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-21. En modalidades particulares, un CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a $TGF\beta 1$ extracelular de $TGF\beta R1$, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-21R; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a $TGF\beta 1$ extracelular de $TGF\beta R2$, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades particulares, un CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a $TGF\beta 1$ extracelular de $TGF\beta R1$, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ ; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a $TGF\beta 1$ extracelular de $TGF\beta R2$, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En modalidades particulares, un CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a $TGF\beta 1$ extracelular de $TGF\beta R1$, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-21R; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a $TGF\beta 1$ extracelular de $TGF\beta R2$, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2R γ . En modalidades

particulares, un CTBR21 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En modalidades particulares, el CTBR21 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-21R; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry. En modalidades particulares, el CTBR21 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-2Ry; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-21R.

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGFβR1 o TGFβR2. En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-21R o IL-2Ry. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1 y un dominio transmembrana IL-21R y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2 y un dominio transmembrana IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1 y un dominio transmembrana IL-2Ry y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a

TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana IL-21R y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico; más preferentemente, un polipéptido 2A autoescindible vírico; y con mayor preferencia un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de teiovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico P2A o T2A.

5. *POLIPÉPTIDOS CTBR18*

La interleucina-18 (IL-18) es una citocina que promueve la actividad y la función de las células T mediante, en parte, el aumento de la expresión de IFN γ , el aumento de la proliferación de células T y la protección contra la muerte celular inducida por activación (AICD). La IL-18 se une al receptor 1 de la interleucina 18, (IL-18R1, también conocido como CD218a) y a la proteína accesoria del receptor de la interleucina 18 (IL-18RAP, CD218b).

La señalización de IL-18 a través de IL-18R1 e IL-18RAP provoca la activación a través de la proteína adaptadora MyD88 y la fosforilación de IRAK4. La fosforilación de IRAK4 y la posterior fosforilación de IRAK1/2 finalmente conduce a la activación de los factores de transcripción de NF-kappa B y AP-1 para aumentar la expresión de IFN γ y la sensibilidad a la IL-12. El programa de transcripción inducido por la IL-18 también aumenta la proliferación de células T y protege contra la AICD.

En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras, que incluyen células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican uno o

más polipéptidos CTBR18. En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un CTBR18 y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4.

En modalidades particulares, el receptor TGF β quimérico convierte una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-18. En modalidades particulares, un CTBR18 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1. En modalidades particulares, un CTBR18 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP.

En modalidades particulares, un CTBR18 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP. En modalidades particulares, un CTBR18 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1.

En modalidades particulares, el CTBR18 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1. En modalidades particulares, el CTBR18 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18R1; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-18RAP.

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGFβR1 o TGFβR2. En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-18R1 o IL-18RAP. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1 y un dominio transmembrana IL-18RAP y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2 y un dominio transmembrana IL-18R1 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1 y un dominio transmembrana IL-18R1 y un dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2 y un dominio transmembrana IL-18RAP y un dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico; más preferentemente, un polipéptido 2A autoescindible vírico; y con mayor preferencia un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A

de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de teiovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico P2A o T2A.

6. *POLIPÉPTIDOS CTBR1*

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina que promueve la actividad y la función de las células T mediante, en parte, el aumento de la expresión de IFN γ , el aumento de la proliferación de células T y la protección contra la muerte celular inducida por activación (AICD). La IL-1 se une al receptor 1 de la interleucina 1, (IL-1R1, también conocido como CD121a) y a la proteína accesoria del receptor 1 de la interleucina (IL-1RAP).

La señalización de IL-1 a través de IL-1R1 e IL-1RAP provoca la activación a través de la proteína adaptadora MyD88 y la fosforilación de IRAK4. La fosforilación de IRAK4 y la posterior fosforilación de IRAK1/2 finalmente conduce a la activación de los factores de transcripción de NF-kappa B y AP-1 para aumentar la expresión de IFN γ y la sensibilidad a la IL-12. El programa de transcripción inducido por la IL-1 también aumenta la proliferación de células T y protege contra la AICD.

En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras, que incluyen células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican uno o más polipéptidos CTBR1. En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un CTBR1 y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4.

En modalidades particulares, el receptor TGF β quimérico convierte una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por IL-1. En modalidades particulares, un CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de

unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1. En modalidades particulares, un CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP.

En modalidades particulares, un CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP. En modalidades particulares, un CTBR1 contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1.

En modalidades particulares, el CTBR1 es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1. En modalidades particulares, el CTBR1 es un complejo de polipéptidos que

comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1R1; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de IL-1RAP.

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF β R1 o TGF β R2. En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de IL-1R1 o IL-1RAP. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1 y un dominio transmembrana IL-1RAP y dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana IL-1R1 y dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1 y un dominio transmembrana IL-1R1 y dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana IL-1RAP y dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico; más preferentemente, un polipéptido 2A autoescindible vírico; y con mayor preferencia un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de teiovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico P2A o T2A.

7. *POLIPÉPTIDOS CTBR.TLR*

Los receptores de tipo Toll (TLR1 a TLR10) son receptores de reconocimiento de patrones que detectan patógenos invasores y activan las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. La activación de los TLR por parte de varios ligandos conduce a la inducción de un programa transcripcional proinflamatorio y la expresión de múltiples citocinas inflamatorias.

La señalización de los TLR se produce mediante la homodimerización de los dominios de señalización de los TLR que conducen a la activación a través de la proteína adaptadora MyD88 y la fosforilación de IRAK4. La fosforilación de IRAK4 y la posterior fosforilación de IRAK1/2 finalmente conduce a la activación de los factores de transcripción de NF-kappa B y AP-1 para aumentar la producción de citosinas inflamatorias e inducir la proliferación. La activación de los TLR también puede provocar la activación de los factores de transcripción IRF3 e IRF7.

En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras, que incluyen células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4, se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican uno o más polipéptidos CTBR.TLR. En varias modalidades, una o más células inmunitarias efectoras se modifican mediante la introducción de uno o más polinucleótidos o vectores que codifican un CTBR.TLR y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4.

En modalidades particulares, el receptor TGFβ quimérico convierte una señal de TGFβ inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora mediada por TLR. En modalidades particulares, un CTBR.TLR contemplado en la presente descripción comprende: un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de TLR; una señal de escisión de polipéptidos; y un dominio de unión a TGFβ1 extracelular de TGFβR2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización de TLR idéntico.

En modalidades particulares, un CTBR.TLR contemplado en la presente descripción comprende un polipéptido de fusión que comprende: un primer polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de TLR; una señal de escisión de polipéptidos; y un segundo polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización de TLR idéntico.

En modalidades particulares, el CTBR.TLR es un complejo de polipéptidos que comprende un primer polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de TLR; y un polipéptido que comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular de TLR idéntico.

En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de TGF β R1 o TGF β R2. En determinadas modalidades, un polipéptido comprende un dominio transmembrana de un TLR. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R1 y un dominio transmembrana TLR y dominio de señalización intracelular. En una modalidad, un polipéptido comprende un dominio de unión a TGF β 1 extracelular de TGF β R2 y un dominio transmembrana TLR y dominio de señalización intracelular.

En modalidades particulares, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico; más preferentemente, un polipéptido 2A autoescindible vírico; y con mayor preferencia un polipéptido autoescindible vírico seleccionado del grupo que consiste en: un péptido (F2A) de virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus Thosa asigna (TaV), un péptido (P2A) de teschovirus 1 porcino (PTV-1), un péptido 2A de teiovirus, y un péptido 2A del virus de

encefalomiocarditis. En una modalidad, la señal de escisión del polipéptido es un polipéptido autoescindible vírico P2A o T2A.

E. POLIPÉPTIDOS

Varios polipéptidos se contemplan en la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a los TCR de MAGEA4, eTCR de MAGEA4, CTBR, proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos anteriores y fragmentos de estos. “Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente, a menos que se especifique lo contrario, y de acuerdo con el significado convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. En una modalidad, un “polipéptido” incluye polipéptidos de fusión y otras variantes. Los polipéptidos pueden prepararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas recombinantes y/o sintéticas bien conocidas. Los polipéptidos no se limitan a una longitud específica, p. ej., pueden comprender una secuencia de proteínas de longitud completa, un fragmento de una proteína de longitud completa, o una proteína de fusión, y pueden incluir modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto las que se producen naturalmente y las que no se producen naturalmente.

Un “péptido aislado” o un “polipéptido aislado” y similares, como se usa en la presente descripción, se refieren al aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula de péptido o polipéptido de un entorno celular, y a partir de la asociación con otros componentes de la célula, es decir, no se asocia significativamente con sustancias *in vivo*.

Los polipéptidos incluyen “variantes de polipéptidos”. Las variantes de polipéptidos pueden diferir de un polipéptido de origen natural en una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones. Tales variantes pueden ser de origen natural o pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, mediante la modificación de una o más de las secuencias de polipéptidos anteriores. Por ejemplo, en modalidades particulares, puede ser conveniente

mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de un polipéptido mediante la introducción de una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones del polipéptido. En modalidades particulares, los polipéptidos incluyen polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 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 %, 86 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias de referencia contempladas en la presente descripción, típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia.

Las variantes de polipéptidos incluyen “fragmentos de polipéptidos” biológicamente activos. Los ejemplos ilustrativos de fragmentos de polipéptidos biológicamente activos incluyen dominios de unión al ADN, dominios de nucleasa, y similares. Como se usa en la presente descripción, el término “fragmento biológicamente activo” o “fragmento biológicamente activo mínimo” se refiere a un fragmento de polipéptido que retiene al menos 100 %, al menos 90 %, al menos 80 %, al menos 70 %, al menos 60 %, al menos 50 %, al menos 40 %, al menos 30 %, al menos 20 %, al menos 10 %, o al menos 5 % de la actividad polipeptídica natural. En determinadas modalidades, un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 1700 aminoácidos de largo. Se apreciará que, en determinadas modalidades, los fragmentos son al menos 5, 6, 7, 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, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 o más aminoácidos de largo.

En modalidades particulares, los polipéptidos expuestos en la presente descripción pueden comprender uno o más aminoácidos denotados como “X”. “X” si está presente en una SEQ ID NO de aminoácidos, se refiere a uno cualquiera o más aminoácidos. En modalidades particulares, las

SEQ ID NO que denotan una proteína de fusión comprenden una secuencia de residuos X continuos que representan acumulativamente cualquier secuencia de aminoácidos.

Como se señaló anteriormente, los polipéptidos pueden alterarse de varias maneras que incluyen sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones se conocen generalmente en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de la secuencia de nucleótidos son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 488-492), Kunkel et al, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), patente de Estados Unidos núm. 4,873,192, Watson, J. D. et al., (*Molecular Biology of the Gene*, Cuarta Edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en ella. En el modelo de Dayhoff et al., (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (*Natl. Biomed. Res. Found*, Washington, D.C.) se puede encontrar instrucciones sobre las sustituciones de aminoácidos adecuadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés.

En determinadas modalidades, una variante de polipéptido comprende una o más sustituciones conservadoras. Una “sustitución conservadora” es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química peptídica esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no se modificaran sustancialmente. Las modificaciones pueden realizarse en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos contemplados en modalidades particulares y aún obtener una molécula funcional que codifica un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante de polipéptido equivalente, o incluso una mejorada, un experto en la técnica, por ejemplo, puede cambiar uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante, p. ej., de acuerdo con la Tabla 1.

TABLA 1: Codones de aminoácidos

Aminoácidos	Código de una letra	Código de tres letras	Codones					
Alanina	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	C	Cys	UGC	UGU				
Ácido aspártico	D	Asp	GAC	GAU				
Ácido glutámico	E	Glu	GAA	GAG				
Fenilalanina	F	Phe	UUC	UUU				
Glicina	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	H	His	CAC	CAU				
Isoleucina	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Lisina	K	Lys	AAA	AAG				
Leucina	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Metionina	M	Met	AUG					
Asparagina	N	Asn	AAC	AAU				
Prolina	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Q	Gln	CAA	CAG				
Arginina	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		

Triptófano	W	Trp	UGG	
Tirosina	Y	Tyr	UAC	UAU

Las instrucciones para determinar qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse, insertarse, o eliminarse sin anular la actividad biológica puede encontrarse mediante el uso de programas informáticos conocidos en la técnica, tales como DNASTAR, DNA Strider, Geneious, Mac Vector, o el software Vector NTI. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas descritas en la presente descripción son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos con o sin carga similar. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural generalmente se dividen en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), y aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En un péptido o proteína, las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos son conocidas por los expertos en la técnica y generalmente pueden hacerse sin alterar una actividad biológica de una molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos únicos en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4a edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224).

En una modalidad, donde se desea la expresión de dos o más polipéptidos, las secuencias de polinucleótidos que los codifican pueden separarse por una secuencia de IRES como se describe en otra parte en la presente descripción.

Los polipéptidos contemplados en modalidades particulares incluyen polipéptidos de fusión. En modalidades particulares, se proporcionan polipéptidos de fusión y polinucleótidos

que codifican polipéptidos de fusión. Los polipéptidos de fusión y proteínas de fusión se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez segmentos de polipéptido.

En otra modalidad, dos o más polipéptidos pueden expresarse como una proteína de fusión que comprende una o más secuencias de polipéptidos autoescindibles como se describe en otra parte de la presente descripción.

Los polipéptidos de fusión pueden comprender uno o más dominios o segmentos de polipéptidos que incluyen, pero no se limitan a péptidos de señal, dominios de péptidos permeables a las células (CPP), dominios de unión al ADN, dominios de nucleasa, *etc.*, etiquetas de epítipo (p. ej., proteína de unión a la maltosa ("MBP"), glutatión S transferasa (GST), HIS6, MYC, FLAG, V5, VSV-G y HA), enlazadores de polipéptidos, y señales de escisión de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión típicamente se unen al extremo C al extremo N, aunque también pueden unirse de extremo C al extremo C, de extremo N al extremo N, o de extremo N al extremo C. En modalidades particulares, los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden. Los polipéptidos de fusión o proteínas de fusión también pueden incluir variantes modificadas de manera conservadora, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias, y homólogos entre especies, siempre que se conserve la actividad deseada del polipéptido de fusión. Los polipéptidos de fusión pueden producirse mediante métodos sintéticos químicos o mediante enlace químico entre los dos restos o pueden prepararse generalmente mediante el uso de otras técnicas estándar. Las secuencias de ADN ligado que comprenden el polipéptido de fusión se unen operativamente a elementos de control transcripcionales o traduccionales adecuados como se describe en otra parte en la presente descripción.

Los polipéptidos de fusión pueden comprender opcionalmente un enlazador que puede usarse para enlazar uno o más polipéptidos o dominios dentro de un polipéptido. Puede emplearse una secuencia enlazadora de péptidos para separar dos o más componentes de polipéptidos por una distancia suficiente para garantizar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras

secundarias y terciarias apropiadas para permitir que los dominios de polipéptidos ejerzan sus funciones deseadas. Tal secuencia enlazadora de péptidos se incorpora en el polipéptido de fusión mediante el uso de técnicas estándar en la técnica. Las secuencias enlazadoras de péptidos adecuadas pueden elegirse en función de los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptido; y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales de polipéptidos. Las secuencias enlazadoras peptídicas preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, como Thr y Ala, también pueden usarse en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadores incluyen las descritas en Maratea et al., *Gene* 40:39-46, 1985; Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258-8262, 1986; patente de Estados Unidos núm. 4,935,233 y patente de Estados Unidos núm. 4,751,180. Las secuencias enlazadoras no son necesarias cuando un segmento de polipéptido de fusión particular contiene regiones de aminoácidos de extremo N no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica. Los enlazadores preferidos son típicamente subsecuencias de aminoácidos flexibles que se sintetizan como parte de una proteína de fusión recombinante. Los polipéptidos enlazadores pueden tener entre 1 y 200 aminoácidos de longitud, entre 1 y 100 aminoácidos de longitud, o entre 1 y 50 aminoácidos de longitud, incluidos todos los valores de números enteros intermedios.

Las señales de escisión de polipéptidos ilustrativas incluyen sitios de reconocimiento de escisión de polipéptidos tales como sitios de escisión de proteasa, sitios de escisión de nucleasa (p. ej., sitios de reconocimiento de enzimas de restricción raras, sitios de reconocimiento de ribozimas autoescindibles), y oligopéptidos víricos autoescindibles (ver de Felipe y Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

El experto conoce los sitios de escisión de proteasa y los péptidos autoescindibles adecuados (véase, p. ej., en Ryan et al., 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak et al. (2004)

Nature Biotech. 5, 589-594). Los sitios de escisión de proteasa ilustrativos incluyen, pero no se limitan a los sitios de escisión de las proteasas NIa de potyvirus (p. ej., proteasa del virus de grabado de tabaco), proteasas HC del potyvirus, proteasas del potyvirus P1 (P35), proteasas NIa del byovirus, proteasas codificadas de ARN-2 de byovirus, proteasas L del aftovirus, proteasas 2A del enterovirus, proteasas 2A del rinovirus, proteasas 3C de picorna, proteasas 24K del comovirus, proteasas 24K del nepovirus, proteasa tipo 3C de RTSV (virus tungroesférico del arroz), proteasa tipo 3C PYVF (virus de manchas amarillas del nabo), proteasa tipo 3C, heparina, trombina, factor Xa y enterocinasa. Debido a su alta rigurosidad de escisión, los sitios de escisión de proteasa de TEV (virus de grabado de tabaco) se prefieren en una modalidad, p. ej., EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 20), por ejemplo, ENLYFQG (SEQ ID NO: 21) y ENLYFQS (SEQ ID NO: 22), en donde X representa cualquier aminoácido (escisión por TEV se produce entre Q y G o Q y S).

En determinadas modalidades, el sitio de polipéptido autoescindible comprende una secuencia o dominio de sitio similar a 2A o 2A (Donnelly *et al*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041). En una modalidad particular, el péptido 2A vírico es un péptido 2A de aftovirus, un péptido 2A de potyvirus, o un péptido 2A de cardiovirus.

En una modalidad, el péptido 2A vírico se selecciona del grupo que consiste en: un péptido (F2A) del virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), un péptido (E2A) del virus A de la rinitis equina (ERAV), un péptido (T2A) del virus de Thosea asigna (TaV), un péptido (P2A) del teschovirus porcino 1 (PTV-1), un péptido 2A del Theilovirus, y un péptido 2A del virus de encefalomiocarditis.

En la Tabla 2 se proporcionan ejemplos ilustrativos de sitios 2A.

TABLA 2:

SEQ ID NO: 23	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 24	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 25	LLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO: 26	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 27	EGRGSLLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 28	LLTCGDVEENPGP
SEQ ID NO: 29	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 30	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 31	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 32	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 33	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 34	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 35	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 36	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 37	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 38	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 39	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 40	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 41	VTELLYRMKRAETYCPRLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 42	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 43	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 44	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

En modalidades preferidas, un polipéptido comprende un TCR de MAGEA4, un eTCR de MAGEA4, o uno o más polipéptidos CTBR.

F. POLINUCLEÓTIDOS

En modalidades particulares, se proporcionan polinucleótidos que codifican los TCR de MAGEA4, CTBR, TCR genomodificados, proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos

anteriores y fragmentos de estos. Como se usa en la presente descripción, los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico” se refieren a ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) e híbridos de ADN/ARN. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y recombinantes, sintéticos, o aislados. Los polinucleótidos incluyen, entre otros: ARN premensajero (pre-ARNm), ARN mensajero (ARNm), ARN sintético, ARNm sintético, ADN genómico (ADNg), ADN amplificado por PCR, ADN complementario (ADNc), ADN sintético, o ADN recombinante. Los polinucleótidos se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 1000, al menos 5000, al menos 10,000, o al menos 15,000 o más nucleótidos de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o una forma modificada de esos tipos de nucleótidos, así como también todas las longitudes intermedias. Se entenderá fácilmente que “longitudes intermedias,” en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 6, 7, 8, 9, *etc.*, 101, 102, 103, *etc.*; 151, 152, 153, *etc.*; 201, 202, 203, *etc.* En modalidades particulares, los polinucleótidos o variantes tienen al menos o aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 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 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de referencia.

En modalidades particulares, los polinucleótidos pueden optimizarse por codones. Como se usa en la presente descripción, el término “optimizado por codones” se refiere a la sustitución de codones en un polinucleótido que codifica un polipéptido para aumentar la expresión, estabilidad y/o actividad del polipéptido. Los factores que influyen en la optimización de codones incluyen, pero no se limitan a uno o más de: (i) variación de sesgos de codones entre dos o más organismos o genes o tablas de sesgo fabricadas sintéticamente, (ii) variación en el grado de sesgo de codones dentro de un organismo, gen, o un conjunto de genes, (iii) variación sistemática de codones, incluido el contexto, (iv) variación de codones de acuerdo con sus ARNt de decodificación, (v) variación de

codones de acuerdo con el % de GC, en general o en una posición del triplete, (vi) variación en el grado de similitud con respecto a una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia de origen natural, (vii) variación en el punto de corte de frecuencia de codones, (viii) propiedades estructurales de los ARNm transcritos de la secuencia de ADN, (ix) conocimiento previo sobre la función de las secuencias de ADN en las que se basará el diseño del conjunto de sustitución de codones, (x) variación sistemática de conjuntos de codones para cada aminoácido, y/o (xi) remoción aislada de sitios de iniciación de traducción falsa.

Como se usa en la presente descripción, el término “nucleótido” se refiere a una base nitrogenada heterocíclica en el enlace N-glucosídico con un azúcar fosforilado. Se entiende que los nucleótidos incluyen bases naturales, y una amplia variedad de bases modificadas reconocidas en la técnica. Tales bases se ubican generalmente en la posición 1' de un resto de azúcar de nucleótidos. Los nucleótidos generalmente comprenden una base, azúcar y un grupo fosfato. En el ácido ribonucleico (ARN), el azúcar es una ribosa, y en el ácido desoxirribonucleico (ADN) el azúcar es una desoxirribosa, es decir, un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la ribosa. Las bases nitrogenadas naturales ilustrativas incluyen las purinas, adenosina (A) y guanidina (G), y las pirimidinas, citidina (C) y timidina (T) (o en el contexto de ARN, uracilo (U)). El átomo C-1 de la desoxirribosa se une a N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina. Los nucleótidos generalmente son mono, di o trifosfatos. Los nucleótidos pueden ser no modificados o modificados en la entidad de azúcar, fosfato y/o base, (también denominados indistintamente como análogos de nucleótidos, derivados de nucleótidos, nucleótidos modificados, nucleótidos no naturales, y nucleótidos no estándar; ver por ejemplo, WO 92/07065 y WO 93/15187). Ejemplos de bases de ácido nucleico modificadas se resumen por Limbach *et al.*, (1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183-2196).

Un nucleótido también puede considerarse como un éster de fosfato de un nucleósido, con una esterificación que ocurre en el grupo hidroxilo unido a C-5 del azúcar. Como se usa en la presente descripción, el término “nucleósido” se refiere a una base nitrogenada heterocíclica en el

enlace N-glucosídico con un azúcar. Los nucleósidos se reconocen en la técnica para incluir bases naturales, y también para incluir bases modificadas bien conocidas. Tales bases se ubican generalmente en la posición 1' de una entidad de azúcar nucleósido. Los nucleósidos generalmente comprenden un grupo de base y azúcar. Los nucleósidos pueden ser no modificados o modificados en el azúcar, y/o la entidad base, (también denominados indistintamente como análogos de nucleósidos, derivados de nucleósidos, nucleósidos modificados, nucleósidos no naturales, o nucleósidos no estándar). Como también se señaló anteriormente, los ejemplos de bases de ácido nucleico modificadas se resumen por Limbach *et al.*, (1994, *Nucleic Acids Res.* 22, 2183-2196).

En varias modalidades ilustrativas, los polinucleótidos contemplados en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a polinucleótidos que codifican los TCR de MAGEA4, eTCR de MAGEA4, uno o más polipéptidos CTBR, polipéptidos de fusión, y vectores de expresión, vectores víricos, y plásmidos de transferencia que comprenden polinucleótidos contemplados en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, los términos “variante de polinucleótidos” y “variante” y similares se refieren a polinucleótidos que muestran identidad de secuencia sustancial con una secuencia de polinucleótidos de referencia o polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen más adelante. Estos términos también abarcan polinucleótidos que se distinguen de un polinucleótido de referencia por la adición, delección, sustitución, o modificación de al menos un nucleótido. En consecuencia, los términos “variante de polinucleótidos” y “variante” incluyen polinucleótidos en los que uno o más nucleótidos se han agregado o eliminado, o modificado, o reemplazados con nucleótidos diferentes. En este sentido, se entiende bien en la técnica que determinadas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, delecciones y sustituciones pueden hacerse a un polinucleótido de referencia por lo que el polinucleótido alterado retiene la actividad o función biológica del polinucleótido de referencia.

En una modalidad, un polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a una secuencia de ácido nucleico diana en condiciones rigurosas. Hibridar en “condiciones rigurosas” describe protocolos de hibridación en los que las secuencias de nucleótidos al menos 60 % idénticas entre sí permanecen hibridadas. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5 °C menos que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (con fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico) a la cual el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio. Dado que las secuencias diana generalmente están presentes en exceso, a T_m , el 50 % de las sondas se ocupan en equilibrio.

Las citas “identidad de secuencia” o, por ejemplo, que comprenden una “secuencia 50 % idéntica a,” como se usa en la presente descripción, se refieren a la medida en que las secuencias son idénticas sobre una base de nucleótido por nucleótido o una base de aminoácido por aminoácido en una ventana de comparación. Por lo tanto, un “porcentaje de identidad de secuencia” puede calcularse mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima en la ventana de comparación, lo que determina la cantidad de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (p. ej., Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val., Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) se producen en ambas secuencias para producir la cantidad de posiciones coincidentes, dividiendo la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 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 %, 86 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias de

referencia descritas en la presente descripción, típicamente donde la variante mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

Los términos usados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” e “identidad sustancial”. Una “secuencia de referencia” es al menos 12 pero frecuentemente de 15 a 18 y a menudo al menos 25 unidades de monómero, que incluyen nucleótidos y residuos de aminoácidos, de longitud. Dado que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente mediante la comparación de secuencias de los dos polinucleótidos con respecto a una “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una “ventana de comparación” se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, usualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más usualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, brechas) de aproximadamente 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o mediante inspección y la mejor alineación (es decir, lo que resulta en el mayor porcentaje de homología de la ventana de comparación) generado por cualquiera de los varios métodos seleccionados. También se puede

hacer referencia a la familia de programas BLAST como por ejemplo divulgado por Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. Se puede encontrar un análisis detallado del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Como se usa en la presente descripción, “polinucleótido aislado” se refiere a un polinucleótido que se ha purificado a partir de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, *p. ej.*, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento. Un “polinucleótido aislado” también se refiere a un ADN complementario (ADNc), un ADN recombinante, u otro polinucleótido que no existe en la naturaleza y que ha sido hecho por la mano de un hombre.

En varias modalidades, un polinucleótido comprende un ARNm que codifica un polipéptido contemplado en la presente descripción. En determinadas modalidades, el ARNm comprende una caperuza, uno o más nucleótidos, y una cola poli(A).

Los términos que describen la orientación de los polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo hidroxilo libre (OH)). Las secuencias de polinucleótidos pueden anotarse en la orientación 5' a 3' o la orientación 3' a 5'. Para el ADN y el ARNm, la hebra 5' a 3' se denomina la hebra “de sentido”, “positiva” o “codificante” porque su secuencia es idéntica a la secuencia del premensajero (ARN_{prem}) [excepto el uracilo (U) en el ARN, en lugar de la timina (T) en el ADN]. Para el ADN y el ARNm, la hebra complementaria 3' a 5' que es la hebra transcrita por la polimerasa del ARN se designa como hebra “plantilla”, “antisentido”, “negativa” o “no codificante”. Como se usa en la presente descripción, el término “orientación inversa” se refiere a una secuencia 5' a 3' escrita en la orientación 3' a 5' o una secuencia 3' a 5' escrita en la orientación 5' a 3'.

Los términos “complementario” y “complementariedad” se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases.

Por ejemplo, la hebra complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A T G 3' es 3' T C A G T A C 5'. Esta última secuencia a menudo se escribe como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5' C A T G A C T 3'. Se dice que una secuencia que es igual a su complemento inverso es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser “parcial”, en la cual solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se emparejan de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O bien, puede haber una complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, o fragmento de variante de este, como se describe en la presente descripción. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en modalidades particulares, por ejemplo, polinucleótidos que se optimizan para la selección de codones humanos y/o primates. En modalidades particulares, los polinucleótidos se optimizan por codones para la expresión y/o estabilidad. Además, también pueden usarse alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente descripción. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

El término “casete de ácido nucleico” o “casete de expresión” como se usa en la presente descripción se refiere a secuencias genéticas dentro del vector que pueden expresar un ARN, y posteriormente un polipéptido. En una modalidad, el casete de ácido nucleico contiene un(os) gen(es) de interés, p. ej., un(os) polinucleótido(s) de interés. En otra modalidad, el casete de ácido nucleico contiene una o más secuencias de control de expresión, p. ej., un promotor, potenciador, secuencia poli(A), y un gen de interés, p. ej., un polinucleótido de interés. Los vectores pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más casetes de ácido nucleico. El casete de ácido

nucleico se orienta posicional y secuencialmente dentro del vector de manera que el ácido nucleico en el casete puede transcribirse en ARN, y cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido, experimentar modificaciones postraduccionales adecuadas requeridas para la actividad en la célula transformada, y translocalizarse al compartimento adecuado para la actividad biológica al dirigirse a compartimentos intracelulares apropiados o a la secreción en compartimientos extracelulares. Preferentemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para la inserción rápida en un vector, p. ej., tiene sitios de endonucleasa de restricción en cada extremo. En una modalidad preferida, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un gen terapéutico usado para tratar, prevenir, o mejorar un trastorno genético. El casete puede retirarse e insertarse en un plásmido o vector vírico como una sola unidad.

Los polinucleótidos incluyen polinucleótido(s) de interés. Como se usa en la presente descripción, el término “polinucleótido de interés” se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido o polipéptido de fusión o un polinucleótido que sirve como plantilla para la transcripción de un polinucleótido inhibitorio, como se contempla en la presente descripción.

Los polinucleótidos contemplados en la presente descripción, independientemente de la longitud de la secuencia de codificación en sí, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias de señales, secuencias Kozak, señales de poliadenilación, sitios enzimáticos de restricción adicionales, múltiples sitios de clonación, sitios de entrada ribosómica interna (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasas (p. ej., sitios LoxP, FRT, y Att), codones de terminación, señales de terminación transcripcional, y polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindibles, etiquetas de epítopos, como se describe en otra parte en la presente descripción o como se conoce en la técnica, de manera que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que puede emplearse un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, con la longitud total preferentemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

Los polinucleótidos pueden prepararse, manipularse, expresarse y/o administrarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Para expresar un polipéptido deseado, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, puede insertarse en el vector apropiado.

Los ejemplos ilustrativos de vectores incluyen, pero no se limitan a plásmido, secuencias de replicación autónoma, y elementos transponibles, p. ej., Sleeping Beauty, PiggyBac.

Ejemplos ilustrativos adicionales de vectores incluyen, entre otros, plásmidos, fagómidos, cósmidos, cromosomas artificiales tales como cromosoma artificial de levadura (YAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC), o cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos tales como fagos lambda o fagos M13, y virus animales.

Los ejemplos ilustrativos de virus útiles como vectores incluyen, entre otros, retrovirus (que incluye lentivirus), adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus (p. ej., virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus, y papovavirus (p. ej., SV40).

Los ejemplos ilustrativos de vectores de expresión incluyen, entre otros, vectores pCIneo (Promega) para la expresión en células de mamíferos; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia génica mediada por lentivirus y la expresión en células de mamíferos. En modalidades particulares, las secuencias codificantes de polipéptidos descritas en la presente descripción pueden ligarse en tales vectores de expresión para la expresión de los polipéptidos en células de mamíferos.

En modalidades particulares, el vector es un vector episómico o un vector que se mantiene extracromosómicamente. Como se usa en la presente descripción, el término “episómico” se refiere a un vector que es capaz de replicarse sin integración en el ADN cromosómico del huésped y sin pérdida gradual de una célula huésped divisoria, lo que también significa que dichos vectores se replican extracromosómicamente o episómicamente.

Las “secuencias de control de expresión”, “elementos de control”, o “secuencias reguladoras” presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector de

origen de replicación, casetes de selección, promotores, potenciadores, intrones de señales de inicio de la traducción (secuencia de Shine Dalgarno o secuencia de Kozak), una secuencia de poliadenilación, regiones no traducidas 5' y 3', las cuales interactúan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la traducción y transcripción. Dichos elementos pueden variar en su concentración y especificidad. En dependencia del sistema de vectores y el huésped utilizado, puede usarse cualquier cantidad de elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluyen promotores ubicuos y promotores inducibles.

En modalidades particulares, un polinucleótido comprende un vector, que incluye pero no se limita a vectores de expresión y vectores víricos. Un vector puede comprender una o más secuencias de control exógenas, endógenas, o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una “secuencia de control endógena” es una que se une naturalmente con un gen dado en el genoma. Una “secuencia de control exógena” es una que se coloca en yuxtaposición a un gen por medio de manipulación genética (es decir, técnicas biológicas moleculares) de manera que la transcripción de ese gen se dirige por el potenciador/promotor enlazado. Una “secuencia de control heteróloga” es una secuencia exógena que es de una especie diferente a la célula que se manipula genéticamente. Una secuencia de control “sintética” puede comprender elementos de una secuencia más endógena y/o exógena, y/o secuencias determinadas *in vitro* o *in silico* que proporcionan actividad promotora y/o potenciadora óptima para la terapia particular.

El término “promotor” como se usa en la presente descripción se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al cual se une una polimerasa de ARN. Una polimerasa de ARN inicia y transcribe polinucleótidos enlazados operativamente al promotor. En modalidades particulares, los promotores que funcionan en células de mamífero comprenden una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases secuencia arriba del sitio donde se inicia la transcripción y/u otra secuencia encontrada 70 a 80 bases secuencia arriba desde el inicio de la transcripción, una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido.

El término “potenciador” se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una transcripción mejorada y, en algunos casos, puede funcionar independientemente de su orientación con relación a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar cooperativa o aditivamente con promotores y/u otros elementos potenciadores. El término “promotor/potenciador” se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar tanto funciones promotoras como potenciadoras.

El término “unido operativamente”, se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. En una modalidad, el término se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, y/o potenciador) y una segunda secuencia de polinucleótidos, p. ej., un polinucleótido de interés, en donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Como se usa en la presente descripción, el término “secuencia de control de expresión constitutiva” se refiere a un promotor, potenciador, o promotor/potenciador que permite de forma continua o continuada la transcripción de una secuencia enlazada operativamente. Una secuencia de control de expresión constitutiva puede ser un promotor, potenciador, o promotor/potenciador “ubicuo” que permite la expresión en una amplia variedad de tipos celulares y tisulares o un promotor, potenciador o promotor/potenciador “específico de células”, “específico de tipo celular”, “específico de linaje celular”, o “específico de tejidos”, que permite la expresión en una variedad restrictiva de tipos celulares y tisulares, respectivamente.

Las secuencias ilustrativas de control de la expresión ubicuas adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen, entre otros, un promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), un virus símico vírico 40 (SV40) (p. ej., temprano o tarde), un promotor de la LTR del virus de la leucemia murina Moloney (MoMLV), una LTR del virus del sarcoma de Rous (VRS), un promotor del virus del herpes simple (VHS) (timidina cinasa), H5, P7.5, y los promotores P11 del virus vaccinia, un promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1a),

respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor 4A1 de iniciación de la traducción eucariota (EIF4A1), proteína 5 de 70kDa de choque térmico (HSPA5), proteína 90kDa beta de choque térmico, miembro 1 (HSP90B1), proteína de 70kDa de choque térmico (HSP70), β -cinesina (β -KIN), locus 26 ROSA humano (Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007), un promotor de la ubiquitina C (UBC), un promotor de la fosfoglicerato cinasa 1 (PGK), un potenciador del citomegalovirus/promotor de la β -actina de pollo (CAG), un promotor de la actina β y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, promotor U3 de sitio de unión al cebador sustituido (MND) dl587rev (Haas *et al.* *Journal of Virology*. 2003;77(17): 9439-9450).

En una modalidad, un vector comprende un promotor de MNDU3.

En una modalidad, un vector comprende un promotor EF1a que comprende el primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad, un vector comprende un promotor EF1a que carece del primer intrón del gen EF1a humano.

En una modalidad particular, puede ser deseable usar una secuencia de control de expresión específica de célula, tipo de célula, linaje celular o tejido para lograr una expresión específica de tipo celular, específica de linaje, o específica de tejido de una secuencia de polinucleótidos deseada (por ejemplo, para expresar un ácido nucleico particular que codifica un polipéptido en solo un subconjunto de tipos celulares, linajes celulares, o tejidos o durante etapas específicas de desarrollo).

En una modalidad particular, puede ser deseable expresar un polinucleótido promotor específico de células T.

Como se usa en la presente descripción, “expresión condicional” puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional que incluye, entre otras, expresión inducible; expresión reprimible; expresión en células o tejidos que tienen un estado fisiológico, biológico, o

patológico particular, *etc.* Esta definición no pretende excluir la expresión específica del tipo de célula o de tejido. Determinadas modalidades proporcionan la expresión condicional de un polinucleótido de interés, p. ej., la expresión se controla al someter una célula, tejido, organismo, *etc.*, a un tratamiento o afección que provoca que el polinucleótido se exprese o que provoca un aumento o disminución en la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido de interés.

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, entre otros, promotores inducibles por esteroides, como los promotores de genes que codifican los receptores de glucocorticoides o de estrógenos (inducibles por el tratamiento con la hormona correspondiente); promotor de metalotionina (inducible mediante tratamiento con diversos metales pesados), promotor MX-1 (inducible por interferón), el sistema “GeneSwitch” regulado por mifepristona (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323: 67), el interruptor génico inducible por cumato (WO 2002/088346), sistemas reguladores dependientes de la tetraciclina, *etc.* Los agentes inductores incluyen, pero no se limitan a glucocorticoides, estrógenos, mifepristona (RU486), metales, interferones, moléculas pequeñas, cumato, tetraciclina, doxiciclina, y variantes de estos.

Como se usa en la presente descripción, un “sitio de entrada de ribosoma interno” o “IRES” se refiere a un elemento que promueve la entrada directa de ribosoma interno al codón de inicio, tal como ATG, de un cistron (una región que codifica una proteína), lo que conduce de esta manera a la traducción del gen independiente de la caperuza. Véase, p. ej., Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83 y Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. Los ejemplos de IRES generalmente empleados por los expertos en la técnica incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 6,692,736. Otros ejemplos de “IRES” conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a IRES obtenibles de picornavirus (Jackson *et al.*, 1990) e IRES obtenibles de fuentes de ARNm vírico o celular, tal como por ejemplo, proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina (BiP), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Huez *et al.* 1998. *Mol.*

Cell. Biol. 18(11):6178-6190), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGFII), el factor de inicio de la traducción eIF4G y los factores de transcripción de levadura TFIID y HAP4, el virus de encefalomicarditis (EMCV) que está disponible comercialmente en Novagen (Duke *et al.*, 1992. *J. Virol* 66(3):1602-9) y el VEGF IRES (Huez *et al.*, 1998. *Mol Cell Biol* 18(11):6178-90). También se han informado IRES en genomas víricos de las especies Picornaviridae, Dicistroviridae y Flaviviridae y en el HCV, el virus de la leucemia murina Friend (FrMLV) y el virus de la leucemia murina Moloney (MoMLV).

En una modalidad, los IRES usados en polinucleótidos contemplados en la presente descripción son un IRES de EMCV.

En modalidades particulares, los polinucleótidos comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia Kozak de consenso y que codifican un polipéptido deseado. Como se usa en la presente descripción, el término “secuencia Kozak” se refiere a una secuencia corta de nucleótidos que facilita en gran medida la unión inicial del ARNm a la subunidad pequeña del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia Kozak de consenso es (GCC)RCCATGG (SEQ ID NO: 45), donde R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. *Cell.* 44(2):283-92, y Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48).

Los elementos que dirigen la terminación eficiente y la poliadenilación de los transcritos de ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de la transcripción generalmente se encuentran secuencia abajo de la señal de poliadenilación. En modalidades particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido a expresar. El término “sitio de poliA” o “secuencia de poliA” como se usa en la presente descripción denota una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN emergente por la polimerasa II de ARN. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia codificante y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficiencia de traducción. La escisión y poliadenilación se dirigen por una secuencia poli(A) en el

ARN. La secuencia de núcleo poli(A) para pre-ARNm de mamíferos tiene dos elementos de reconocimiento que flanquean un sitio de escisión-poliadenilación. Típicamente, un hexámero AAUAAA casi invariable se encuentra 20-50 nucleótidos secuencia arriba de un elemento más variable rico en residuos U o GU. La escisión de la transcripción emergente se da entre estos dos elementos y se acopla a la adición de hasta 250 adenosinas al producto de escisión 5'. En modalidades particulares, la secuencia de núcleo poli(A) es una secuencia de poliA ideal (p.ej., AATAAA, ATTAAA, AGTAAA). En modalidades particulares, la secuencia poli(A) es una secuencia poliA SV40, una secuencia poliA de hormona de crecimiento bovino (BGHpA), una secuencia poliA de β -globina de conejo (r β gpA), u otra secuencia poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

En algunas modalidades, un polinucleótido o célula que alberga el polinucleótido utiliza un gen suicida, que incluye un gen suicida inducible para reducir el riesgo de toxicidad directa y/o proliferación no controlada. En modalidades específicas, el gen suicida no es inmunogénico para el huésped que alberga el polinucleótido o célula. Un ejemplo determinado de un gen suicida que puede usarse es caspasa-9 o caspasa-8 o citosina desaminasa. El Caspasa-9 puede activarse mediante el uso de un inductor químico específico de la dimerización (CID).

En modalidades particulares, uno o más polinucleótidos que codifican una cadena TCR α de MAGEA4 y una cadena TCR β , que incluyen cadenas de eTCR, y/o uno o más polipéptidos CTBR se introducen en una célula (p.ej., una célula inmunitaria efectora) mediante vectores no víricos o víricos. El término "vector" se usa en la presente descripción para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido generalmente se enlaza, p. ej., se inserta en la molécula de ácido nucleico del vector. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en el ADN de la célula huésped. En modalidades particulares, los vectores no

víricos se usan para administrar uno o más polinucleótidos contemplados en la presente descripción a una célula T.

Los ejemplos ilustrativos de vectores no víricos incluyen, pero no se limitan a ARNm, plásmidos (p. ej., plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), transposones, cósmidos, y cromosomas artificiales bacterianos.

Los métodos ilustrativos de administración no vírica de polinucleótidos contemplados en modalidades particulares incluyen, entre otros: electroporación, sonoporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, nanopartículas, policación o conjugados de lípidos:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, transferencia mediada por dextrano DEAE, cañón de genes y choque térmico.

Los ejemplos ilustrativos de sistemas de administración de polinucleótidos adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en modalidades particulares incluyen, pero no se limitan a los proporcionados por Amaxa Biosystems, Maxcyte, Inc., BTX Molecular Delivery Systems, y Copernicus Therapeutics Inc. Los reactivos de lipofección se venden comercialmente (p. ej., Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para una lipofección eficiente de reconocimiento de receptores de polinucleótidos se han descrito en la bibliografía. Véase p. ej., Liu *et al.* (2003) *Gene Therapy* 10:180–187; y Balazs *et al.* (2011) *Journal of Drug Delivery*. 2011:1-12. La administración dirigida a anticuerpos, derivada bacterianamente, basada en nanocélulas no vivas también se contempla en modalidades particulares.

En varias modalidades, el polinucleótido es un ARNm que se introduce en una célula para expresar transitoriamente un polipéptido deseado. Como se usa en la presente descripción, “transitorio” se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un período de horas, días o semanas, en donde el período de tiempo de expresión es menor que el período de tiempo para la expresión del polinucleótido si se integra en el genoma o se contiene dentro de un replicón de plásmido estable en la célula.

En modalidades particulares, los vectores víricos se usan para administrar uno o más polinucleótidos contemplados en la presente descripción a una célula T.

Ejemplos ilustrativos de sistemas de vectores víricos adecuados para su uso en modalidades particulares contempladas en la presente descripción incluyen, entre otros, vectores de virus adenoasociados (AAV), retrovirus (incluido el lentivirus), virus del herpes simple, adenovirus, y virus de vaccinia.

En modalidades particulares, un polinucleótido policistrónico que codifica un TCR de MAGEA4 (SEQ ID NO: 4) que comprende una cadena TCR α (SEQ ID NO: 2) y una cadena TCR β (SEQ ID NO: 3) y un polinucleótido policistrónico que codifica un CTBR (SEQ ID NO: 8) se introducen en una célula mediante el uso de vectores no víricos o víricos. En modalidades particulares, un polinucleótido policistrónico que codifica una proteína de fusión que codifica un eTCR de MAGEA4 (SEQ ID NO: 7) que comprende una cadena eTCR α (SEQ ID NO: 5) y una cadena eTCR β (SEQ ID NO: 6) y un polinucleótido policistrónico que codifica un CTBR (SEQ ID NO: 8) se introducen en una célula mediante el uso de vectores no víricos o víricos.

En modalidades particulares, un polinucleótido policistrónico que codifica un TCR de MAGEA4 (SEQ ID NO: 4) que comprende una cadena TCR α (SEQ ID NO: 2) y una cadena TCR β (SEQ ID NO: 3) y un CTBR (SEQ ID NO: 8) se introducen en una célula mediante el uso de un vector no vírico o vírico. En modalidades particulares, un polinucleótido policistrónico que codifica una proteína de fusión que codifica un eTCR de MAGEA4 (SEQ ID NO: 7) que comprende una cadena eTCR α (SEQ ID NO: 5) y una cadena eTCR β (SEQ ID NO: 6) y un CTBR (SEQ ID NO: 8) se introducen en una célula mediante el uso de un vector no vírico o vírico.

G. CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

En varias modalidades, las células se modifican para expresar un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y CTBR, para su uso en el tratamiento del cáncer. Las células pueden

modificarse no genéticamente para expresar los polipéptidos contemplados en la presente descripción, o en modalidades preferidas particulares, las células pueden modificarse genéticamente para expresar los polipéptidos contemplados en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, el término “diseñado genéticamente” o “modificado genéticamente” se refiere a la adición de material genético adicional en la forma de ADN o ARN en el material genético total en una célula. Los términos, “células modificadas genéticamente”, “células modificadas”, y “células redirigidas”, se usan indistintamente en modalidades particulares.

En modalidades particulares, el TCR de MAGEA4 y uno o más polipéptidos CTBR contemplados en la presente descripción se introducen y expresan en células inmunitarias efectoras para mejorar la resistencia de las células a las señales inmunosupresoras en el TME mediado por TGF β . En modalidades particulares, el eTCR de MAGEA4 y uno o más polipéptidos CTBR se introducen y expresan en células inmunitarias efectoras.

Una “célula inmunitaria efectora” es cualquier célula del sistema inmunitario que tiene una o más funciones efectoras (p. ej., actividad citotóxica de destrucción de células, secreción de citocinas, inducción de ADCC y/o CDC). Las células inmunitarias efectoras ilustrativas contempladas en la presente descripción son células T, en particular células T citotóxicas (CTL; células T CD8+), TIL, y células T cooperadoras (HTL; células T CD4+. En una modalidad, las células inmunitarias efectoras incluyen células citolíticas naturales (NK). En una modalidad, las células inmunitarias efectoras incluyen células T citolíticas naturales (NKT). Las células inmunitarias efectoras pueden ser autólogas/autogénicas (“propias”) o no autólogas (“externas”, p. ej., alogénicas, singénicas o xenogénicas).

“Autólogo”, como se usa en la presente descripción, se refiere a células del mismo sujeto. “Alogénico”, como se usa en la presente descripción, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente de la célula en comparación. “Singénico”, como se usa en la presente descripción, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente

idénticas a la célula en comparación. “Xenogénico”, como se usa en la presente descripción, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En modalidades preferidas, las células son autólogas.

Las células inmunitarias efectoras ilustrativas adecuadas para introducir polipéptidos CTBR contempladas en la presente descripción incluyen células T. Los términos “células T” o “linfocitos T” se reconocen en la técnica y se pretende que incluyan timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo, o linfocitos T activados. Una célula T puede ser una célula T cooperadora (Th), por ejemplo una célula T cooperadora 1 (Th1) o una célula T cooperadora 2 (Th2). La célula T puede ser una célula T cooperadora (HTL; célula T CD4⁺) célula T CD4, una célula T citotóxica (CTL; célula T CD8⁺), célula T CD4⁺CD8⁺, célula T CD4⁺CD8⁻, o cualquier otro subconjunto de células T. Otras poblaciones ilustrativas de células T adecuadas para su uso en modalidades particulares incluyen células T sin tratamiento previo y células T de memoria.

Como comprendería el experto, otras células también pueden usarse como células inmunitarias efectoras con TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y uno o más polipéptidos CTBR contemplados en la presente descripción. En particular, las células inmunitarias efectoras también incluyen células NK, células NKT, neutrófilos, y macrófagos. Las células inmunitarias efectoras también incluyen progenitores de células efectoras en donde tales células progenitoras pueden inducirse para diferenciarse en células inmunitarias efectoras *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, en modalidades particulares, la célula inmunitaria efectora incluye progenitores de células inmunitarias efectoras tales como células madre hematopoyéticas (HSC) contenidas dentro de la población de células CD34⁺ derivadas de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica movilizada que, tras la administración en un sujeto, se diferencian en células inmunitarias efectoras maduras, o que pueden inducirse *in vitro* para diferenciarse en células inmunitarias efectoras maduras.

Como se usa en la presente descripción, las células inmunitarias efectoras modificadas genéticamente para contener un receptor quimérico específico pueden denominarse “células inmunitarias efectoras redirigidas específicas de antígenos”.

El término, “célula CD34+,” como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula que expresa la proteína CD34 en su superficie celular. La “CD34”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una glucoproteína de la superficie celular (p. ej., proteína sialomucina) que a menudo actúa como un factor de adhesión célula-célula y participa en la entrada de células T en los ganglios linfáticos. La población de células CD34 + contiene células madre hematopoyéticas (HSC), que tras la administración a un paciente diferencian y contribuyen a todos los linajes hematopoyéticos, incluidos las células T, células NK, células NKT, neutrófilos y células del linaje de monocitos/macrófagos.

Los métodos para fabricar las células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y un polipéptido receptor de TGF β quimérico contemplado en la presente descripción se proporcionan en modalidades particulares. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células inmunitarias efectoras aisladas de un individuo de manera que las células inmunitarias efectoras expresan un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y uno o más polipéptidos de receptor TGF β quimérico como se contempla en la presente descripción. En una modalidad, el método comprende transfectar o transducir células inmunitarias efectoras aisladas de un individuo de manera que las células inmunitarias efectoras expresan un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y uno o más polipéptidos de receptor TGF β quimérico y TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 contemplados en la presente descripción. En determinadas modalidades, las células inmunitarias efectoras se aíslan de un individuo y se modifican genéticamente sin manipulación adicional *in vitro*. Tales células pueden entonces volver a administrarse directamente en el individuo. En modalidades adicionales, las células inmunitarias efectoras se activan y estimulan por primera vez para

proliferar *in vitro* antes de ser modificadas genéticamente. En este sentido, las células inmunitarias efectoras pueden cultivarse antes y/o después de ser modificadas genéticamente.

En modalidades particulares, antes de la manipulación o modificación genética *in vitro* de las células inmunitarias efectoras descritas en la presente descripción, la fuente de células se obtiene de un sujeto. En modalidades particulares, las células inmunitarias efectoras modificadas comprenden células T.

Las células T pueden obtenerse de una cantidad de fuentes que incluyen, entre otros, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo, y tumores. En determinadas modalidades, las células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recolectada de un sujeto mediante el uso de cualquier cantidad de técnicas conocidas por el experto, tales como sedimentación, p. ej., separación de FICOLL™.

En otras modalidades, se usa una población aislada o purificada de células T. En algunas modalidades, después del aislamiento de PBMC, los linfocitos T citotóxicos y cooperadores pueden clasificarse en subpoblaciones de células T sin tratamiento previo, de memoria y efectoras antes o después de la activación, expansión y/o modificación genética.

En una modalidad, una población aislada o purificada de células T expresa uno o más de los marcadores que incluyen, pero no se limitan a un CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, o una combinación de estos.

En determinadas modalidades, las células T se aíslan de un individuo y se activan y estimulan por primera vez para proliferar *in vitro* antes de modificarse para expresar un polipéptido de receptor TGFβ quimérico.

Para lograr dosis terapéuticas suficientes de composiciones de células T, las células T a menudo se someten a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las células T pueden activarse y expandirse generalmente mediante el uso de métodos como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964;

5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; y 6,867,041, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción mediante referencia. En modalidades particulares, las células T se activan y se expanden durante aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas o aproximadamente 24 horas antes de la introducción de vectores o polinucleótidos que codifican el TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y los polipéptidos de receptores de TGF β quiméricos.

En una modalidad, las células T se activan al mismo tiempo que se modifican.

En varias modalidades, un método para generar una célula inmunitaria efectora comprende activar una población de células que comprenden células T y expandir la población de células T. La activación de las células T puede lograrse proporcionando una señal de estimulación primaria a través del complejo TCR/CD3 de células T y proporcionando una señal de coestimulación secundaria a través de una molécula accesoria, p. ej., CD28.

El complejo TCR/CD3 puede estimularse al poner en contacto la célula T con un agente de unión a CD3 adecuado, p. ej., un ligando de CD3 o un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los ejemplos ilustrativos de anticuerpos CD3 incluyen, entre otros, OKT3, G19-4, BC3, y 64.1.

Además de la señal de estimulación primaria proporcionada a través del complejo TCR/CD3, la inducción de las respuestas de las células T requiere una segunda señal coestimuladora. En modalidades particulares, un agente de unión a CD28 puede usarse para proporcionar una señal coestimuladora. Los ejemplos ilustrativos de agentes de unión a CD28 incluyen, pero no se limitan a: ligandos CD 28 naturales, p. ej., un ligando natural para CD28 (p. ej., un miembro de la familia de proteínas B7, tal como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86); y un anticuerpo monoclonal anti-CD28 o fragmento de este capaz de reticular la molécula de CD28, p. ej. anticuerpos monoclonales 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2, y EX5.3D10.

En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora se acoplan a la misma superficie.

En determinadas modalidades, los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se localizan en la superficie de una célula. Esto puede lograrse transfectando o transduciendo una célula con un ácido nucleico que codifica el agente de unión en una forma adecuada para su expresión en la superficie celular o alternativamente acoplando un agente de unión a la superficie celular.

En otra modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora se muestran en células presentadoras de antígenos.

En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de estimulación primaria, por ejemplo, una molécula que proporciona estimulación a través del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora se proporcionan en superficies separadas.

En una modalidad determinada, uno de los agentes de unión que proporciona señales estimuladoras y coestimuladoras es soluble (proporcionado en solución) y el/los otro(s) agente(s) se proporciona(n) en una o más superficies.

En una modalidad particular, los agentes de unión que proporcionan señales estimuladoras y coestimuladoras se proporcionan ambos en una forma soluble (proporcionada en solución).

En varias modalidades, los métodos para fabricar células T contempladas en la presente descripción comprenden células T activadoras con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

En una modalidad, las células T de expansión activados por los métodos contemplados en la presente descripción comprenden además cultivar una población de células que comprenden células T durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 7 días a aproximadamente 28 días o cualquier valor entero por hora entre medio. En otra modalidad, la composición de células T puede cultivarse durante 14 días. En una modalidad particular, las células

T se cultivan durante aproximadamente 21 días. En otra modalidad, las composiciones de células T se cultivan durante 2-3 días. Varios ciclos de estimulación/activación/expansión también pueden desearse de manera que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más.

En modalidades particulares, las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio adecuado (p. ej., Minimal Essential Media or RPMI Media 1640 or, X-vivo 15, (Lonza)) y uno o más factores necesarios para la proliferación y viabilidad que incluyen, pero no se limitan a suero (p. ej., suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , y TNF- α o cualquier otro aditivo adecuado para el crecimiento de células conocidas por el experto en la técnica.

Ejemplos ilustrativos adicionales de medios de cultivo celular incluyen, pero no se limitan a RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos agregados, piruvato de sodio, y vitaminas, ya sea sin suero o complementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma), o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad suficiente de citosinas para el crecimiento y expansión de las células T.

Los antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infundirán en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para respaldar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (p. ej., 37 °C) y atmósfera (p. ej., aire más 5 % de CO₂).

En modalidades particulares, las PBMC o células T aisladas se ponen en contacto con un agente estimulador y un agente coestimulador, tal como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una esfera u otra superficie, en un medio de cultivo con citocinas apropiadas, tal como IL-2, IL-7, y/o IL-15.

En otras modalidades, la APC artificial (aAPC) fabricada mediante células K562, U937, 721.221, T2, C1R de genomodificación para dirigir la expresión y secreción estables, de una variedad de moléculas coestimuladoras y citocinas. En una modalidad particular, las aAPC K32 o U32 se usan para dirigir la visualización de una o más moléculas estimuladoras basadas en

anticuerpos en la superficie celular de la AAPC. Las poblaciones de células T pueden expandirse mediante aAPC que expresan una variedad de moléculas coestimuladoras que incluyen, pero no se limitan a, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L), y/o CD80 o CD86. Finalmente, las aAPC proporcionan una plataforma eficiente para expandir las células T genéticamente modificadas y mantener la expresión de CD28 en las células T CD8. Las aAPC proporcionadas en WO 03/057171 y US2003/0147869 se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En una modalidad particular, uno o más polinucleótidos que codifican un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4 y un receptor de TGF β quimérico se introducen en la población de células T. En una modalidad particular, un polinucleótido que codifica un receptor de TGF β quimérico se introduce en una población de células T que expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4. En una modalidad particular, un polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4 se introduce en una población de células T que expresan un receptor de TGF β quimérico. En una modalidad particular, un polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4 y un receptor de TGF β quimérico se introduce en una población de células T. En una modalidad particular, un polinucleótido que codifica un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4 y un polinucleótido que codifica un receptor de TGF β quimérico se introducen simultáneamente en una población de células T. Los polinucleótidos pueden introducirse en las células T mediante microinyección, transfección, lipofección, choque térmico, electroporación, transducción, cañón de genes, microinyección, transferencia mediada por DEAE-dextrano, y similares.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción vírica.

Los ejemplos ilustrativos de sistemas de vectores víricos adecuados para introducir un polinucleótido en una célula inmunitaria efectora o célula CD34⁺ incluyen, pero no se limitan a vectores de virus adenoasociado (AAV), retrovirus, virus del herpes simple, adenovirus, virus vaccinia para la transferencia génica.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción de AAV.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción retroviral.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción lentiviral.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción de adenovirus.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción del virus del herpes simple.

En una modalidad, los polinucleótidos se introducen en una célula T mediante transducción del virus vaccinia.

H. COMPOSICIONES Y FORMULACIONES

Las composiciones contempladas en la presente descripción pueden comprender uno o más polipéptidos de TCR de MAGEA4, polipéptidos de eTCR de MAGEA4, polipéptidos de CTBR, polinucleótidos, vectores que comprenden las mismas, células inmunitarias efectoras modificadas genéticamente, etc., como se contempla en la presente descripción. Las composiciones incluyen, entre otras, composiciones farmacéuticas. En modalidades preferidas, una composición comprende una o más células modificadas para expresar un TCR de MAGEA4 y un CTBR. En modalidades preferidas, una composición comprende una o más células modificadas para expresar un eTCR de MAGEA4 y un polipéptido CTBR12.

Una “composición farmacéutica” se refiere a una composición formulada en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o a un animal, ya sea solo, o en combinación con una o más otras modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones pueden administrarse en

combinación con otros agentes también, tales como, p. ej., citocinas, factores de crecimiento, hormonas, moléculas pequeñas, quimioterápicos, profármacos, fármacos, anticuerpos, u otros diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten negativamente la capacidad de la composición para administrar la terapia prevista. En modalidades preferidas, una composición farmacéutica comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y una o más células que se han modificado para expresar un TCR de MAGEA4 y un CTBR, preferentemente un eTCR de MAGEA4 y un polipéptido de CTBR12.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en la presente descripción para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen criterio médico, son adecuados 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.

Como se usa en la presente descripción “portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye, pero no se limita a solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadoras de fosfato; y cualquier otra sustancia compatible empleada en formulaciones farmacéuticas.

En modalidades particulares, las composiciones comprenden una cantidad de células inmunitarias efectoras que expresan un TCR de MAGEA4 y un CTBR, preferentemente un eTCR de MAGEA4 y un polipéptido CTBR12. Como se usa en la presente descripción, el término “cantidad” se refiere a “una cantidad eficaz” de una célula terapéutica modificada genéticamente, p. ej., célula T, para lograr un resultado profiláctico o terapéutico beneficioso o deseado, que incluye resultados clínicos.

Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de células terapéuticas modificadas genéticamente eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado.

Generalmente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz es menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una célula terapéutica modificada genéticamente puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o las células terapéuticas transducidas son superadas por los efectos terapéuticamente beneficiosos. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” incluye una cantidad que es eficaz para “tratar” a un sujeto (p. ej., un paciente). Cuando se indica una cantidad terapéutica, la cantidad precisa de las composiciones que se administrarán puede determinarse por un médico que tenga en cuenta las diferencias individuales en la edad, el peso, el tamaño del tumor, la extensión de la infección o la metástasis, y el estado del paciente (sujeto).

Puede afirmarse generalmente que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en la presente descripción puede administrarse a una dosificación de 10^6 to 10^{13} células/kg de peso corporal, preferentemente 10^8 to 10^{13} células/kg de peso corporal, que incluye todos los valores enteros dentro de esos rangos. La cantidad de células dependerá del uso final para el cual se pretende la composición como lo hará el tipo de células incluidas en ella. Para los usos proporcionados en la presente descripción, las células generalmente están en un volumen de un litro o menos, pueden ser 500 ml o menos, incluso 250 ml o 100 ml o menos. Por lo tanto, la densidad de las células deseadas es típicamente mayor que 10^6 células/ml y generalmente es mayor que 10^7 células/ml, generalmente 10^8 células/ml o mayor. La cantidad clínicamente relevante de células inmunitarias puede distribuirse en múltiples infusiones que acumulativamente igualan o superan a 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} células. Las composiciones pueden administrarse múltiples veces en dosis dentro de estos

rangos. Las células pueden ser alogénicas, singénicas, xenogénicas o autólogas para el paciente que se somete a terapia.

Las composiciones se formulan preferentemente para administración parenteral, p. ej., administración intravascular (intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otras formas similares, pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, o cloruro de sodio isotónico. La preparación parenteral se puede colocar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

En una modalidad, las composiciones de células T contempladas en la presente descripción se formulan en un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son adecuadas para la administración a sujetos humanos. En modalidades particulares, el medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable es un medio sin suero.

El medio sin suero tiene varias ventajas sobre el medio que contiene suero, incluida una composición simplificada y mejor definida, un grado reducido de contaminantes, la eliminación de una posible fuente de agentes infecciosos y un costo más bajo. En varias modalidades, el medio sin suero está libre de animales, y opcionalmente puede estar libre de proteínas. Opcionalmente, el medio puede contener proteínas recombinantes biofarmacéuticamente aceptables. Medio “libre de animales” se refiere a un medio en donde los componentes se derivan de fuentes no animales. Las proteínas recombinantes reemplazan a las proteínas animales nativas en medio libre de animales y los nutrientes se obtienen de fuentes sintéticas, vegetales o microbianas. El medio “libre de proteínas”, por el contrario, se define como sustancialmente libre de proteínas.

Ejemplos ilustrativos de medios sin suero usados en composiciones particulares incluyen, entre otros, QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies), y X-VIVO 10.

En una modalidad preferida, las composiciones que comprenden células inmunitarias efectoras contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende PlasmaLyte A.

En otra modalidad preferida, las composiciones que comprenden células inmunitarias efectoras contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende un medio de crioconservación. Por ejemplo, los medios de crioconservación con agentes de crioconservación pueden usarse para mantener un resultado de viabilidad celular alta después de la descongelación. Los ejemplos ilustrativos de medios de crioconservación usados en composiciones particulares incluyen, entre otros, CryoStor CS10, CryoStor CS5, y CryoStor CS2.

En una modalidad más preferida, las composiciones que comprenden células inmunitarias efectoras contempladas en la presente descripción se formulan en una solución que comprende 50:50 PlasmaLyte A con respecto a CryoStor CS10.

En una modalidad particular, las composiciones comprenden una cantidad eficaz de células inmunitarias efectoras editadas del genoma modificadas para expresar un TCR de MAGEA4 y un CTBR, preferentemente un eTCR de MAGEA4 y un polipéptido CTBR12, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. Por lo tanto, las composiciones de células inmunitarias efectoras pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como terapia de radiación, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos. Tales agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un estado de enfermedad particular como se describe en la presente descripción, tal como un cáncer particular. Los

agentes terapéuticos ilustrativos contemplados en modalidades particulares incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, FARME, antiinflamatorios, quimioterápicos, radioterápicos, anticuerpos terapéuticos, u otros agentes activos y auxiliares.

En determinadas modalidades, las composiciones que comprenden células inmunitarias efectoras editadas del genoma modificadas para expresar un TCR de MAGEA4 y un CTBR, preferentemente un eTCR de MAGEA4 y un polipéptido CTBR12 pueden administrarse junto con cualquier cantidad de agentes quimioterápicos.

En modalidades particulares, una composición que comprende el efector inmunitario modificado para expresar un TCR de MAGEA4 y un CTBR, preferentemente un eTCR de MAGEA4 y un polipéptido CTBR12 se administra con un anticuerpo terapéutico. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos terapéuticos adecuados para la combinación con las células T modificadas contemplados en modalidades particulares, incluyen, entre otros, atezolizumab, avelumab, bavituximab, bevacizumab (avastin), bivatuzumab, blinatumomab, conatumumab, crizotinib, daratumumab, duligotumab, dacetuzumab, dalotuzumab, durvalumab, elotuzumab (HuLuc63), gemtuzumab, ibritumomab, indatuximab, inotuzumab, ipilimumab, lorvotuzumab, lucatumumab, milatuzumab, moxetumomab, nivolumab, ocaratuzumab, ofatumumab, pembrolizumab, rituximab, siltuximab, teprotumumab, y ublituximab.

En modalidades particulares, la formulación de soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, así como el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en la presente descripción en una variedad de regímenes de tratamiento, incluidos, p. ej., enteral y parenteral, p. ej., intravascular, intravenoso, intrarterial, intraóseamente, intraventricular, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intratecal, y la administración y formulación intramedular. El experto en la técnica comprendería que las modalidades particulares contempladas en la presente descripción pueden comprender otras formulaciones, tales como las que se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se describen,

por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, volumen I y volumen II. 22.^a edición. Editado por Loyd V. Allen Jr. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press; 2012, que se incorpora como referencia en la presente descripción, en su totalidad.

I. MÉTODOS TERAPÉUTICOS

Las células inmunitarias efectoras, que incluyen células T con TCR de MAGEA4 o células T con eTCR de MAGEA4, que comprenden un CTBR contemplado en la presente descripción proporcionan métodos mejorados de inmunoterapia adoptiva para su uso en la prevención, el tratamiento y la mejora de cánceres, o para prevenir, tratar, o mejorar al menos un síntoma asociado con un cáncer.

Las células inmunitarias efectoras que comprenden un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y un CTBR contemplado en la presente descripción proporcionan productos farmacológicos mejorados para su uso en la prevención, tratamiento, o mejora de al menos un síntoma de un cáncer, EICH, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, o una inmunodeficiencia. Como se usa en la presente descripción, el término “producto farmacológico” se refiere a células modificadas producidas mediante el uso de las composiciones y métodos contemplados en la presente descripción. En modalidades particulares, el producto farmacológico comprende células inmunitarias efectoras modificadas genéticamente, células T modificadas para expresar un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 modificados además para expresar un polipéptido CTBR. Además, las células T modificadas contempladas en modalidades particulares proporcionan terapias celulares adoptivas más seguras y eficaces porque son resistentes al agotamiento de las células T y muestran una mayor durabilidad y persistencia en el microambiente tumoral que puede conducir a una terapia sostenida.

En modalidades particulares, una cantidad eficaz de células inmunitarias efectoras modificadas o células T que comprenden o expresan un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4 y un CTBR se administran a un sujeto para prevenir, tratar, o mejorar al menos un

síntoma de un cáncer, EICH, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, o una inmunodeficiencia.

En modalidades particulares, un método para prevenir, tratar, o mejorar al menos un síntoma de un cáncer comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de células inmunitarias efectoras modificadas o células T que comprenden o expresan un CTBR y un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4. Las células modificadas genéticamente son un producto farmacológico más duradero y persistente porque las células son más resistentes a las señales inmunosupresoras del microambiente tumoral en virtud de convertir una señal de TGF β inmunosupresora en una señal inmunoestimuladora.

En modalidades particulares, las células efectoras inmunitarias modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de tumores sólidos o cánceres.

En modalidades particulares, las células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de tumores sólidos o cánceres que incluyen, entre otros: el cáncer suprarrenal, carcinoma corticosuprarrenal, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, teratoma/tumor rabdoide atípico, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro/SNC, cáncer de mama, tumores bronquiales, tumores cardíacos, cáncer de cuello uterino, colangiocarcinoma, condrosarcoma, cordoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, carcinoma ductal in situ (DCIS), cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioneuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de ojo, cáncer de las trompas de Falopio, histiosarcoma fibroso, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores carcinoides gastrointestinales, tumor estromal gastrointestinal (GIST), de células germinales, glioma, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, hemangioblastoma, cáncer hepatocelular, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, sarcoma de kaposi, cáncer de riñón, cáncer laríngeo, leiomiomasarcoma, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumor carcinoide pulmonar, mesotelioma

maligno, carcinoma de médula ósea, meduloblastoma, menangioma, melanoma, carcinoma de células de Merkel, carcinoma de línea media, cáncer de boca, mixosarcoma, síndrome mielodisplásico, neoplasias mieloproliferativas, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, oligodendroglioma, cáncer bucal, cáncer de la cavidad bucal, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, tumores de células de los islotes pancreáticos, carcinoma papilar, paraganglioma, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pinealoma, tumor hipofisario, blastoma pleuropulmonar, cáncer peritoneal primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, retinoblastoma, carcinoma de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, carcinoma de las glándulas sebáceas, cáncer de piel, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de células pequeñas del pulmón, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, carcinoma de las glándulas sudoríparas, sinovioma, cáncer de testículos, cáncer de garganta, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer uretral, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vascular, cáncer de vulva, y tumor de Wilms.

En modalidades particulares, las células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de tumores sólidos o cánceres que incluyen, entre otros, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de hueso, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, o cáncer de piel.

En modalidades particulares, las células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de varios cánceres que incluyen, pero no se limitan al pancreático, de vejiga, y de pulmón.

En modalidades particulares, las células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de cánceres líquidos o cánceres hematológicos.

En modalidades particulares, las células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de neoplasias malignas de células B, que incluyen, entre otros: leucemias, linfomas, y mieloma múltiple.

En modalidades particulares, las células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción se usan en el tratamiento de cánceres líquidos que incluyen, entre otros, leucemias, linfomas, y mielomas múltiples: leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica crónica (LLC), y leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) y policitemia vera, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin con predominio linfocítico ganglionar, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño (LLP), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, síndrome de Sézary, linfoma linfoblástico T precursor, mieloma múltiple, mieloma múltiple evidente, mieloma múltiple latente, leucemia de células plasmáticas, mieloma no secretor, mieloma IgD, mieloma osteoesclerótico, plasmacitoma óseo solitario, y plasmacitoma extramedular.

Las células preferidas para su uso en los métodos contemplados en la presente descripción incluyen células autólogas/autogénicas ("propias"), preferentemente células hematopoyéticas, más preferentemente células T, y más preferentemente células inmunitarias efectoras.

En modalidades particulares, se proporcionan métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción o una composición que comprende la misma, a un paciente que lo necesita, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. En determinadas modalidades, las células se usan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar un cáncer, EICH, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, o una

inmunodeficiencia. Por lo tanto, modalidades particulares comprenden el tratamiento o prevención o mejora de al menos un síntoma de un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria, o una inmunodeficiencia que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células editadas del genoma contempladas en la presente descripción.

En una modalidad, un método para tratar un cáncer, EICH, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, o una inmunodeficiencia en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad eficaz, p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células inmunitarias efectoras modificadas contempladas en la presente descripción. La cantidad y frecuencia de la administración se determinarán por factores tales como el estado del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis adecuadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

En una modalidad ilustrativa, la cantidad eficaz de células inmunitarias efectoras modificadas proporcionadas a un sujeto es de al menos 2×10^6 células/kg, al menos 3×10^6 células/kg, al menos 4×10^6 células/kg, al menos 5×10^6 células/kg, al menos 6×10^6 células/kg, al menos 7×10^6 células/kg, al menos 8×10^6 células/kg, al menos 9×10^6 células/kg, o al menos 10×10^6 células/kg, o más células/kg incluidas todas las dosis de células intervinientes.

En otra modalidad ilustrativa, la cantidad eficaz de células inmunitarias efectoras modificadas proporcionadas a un sujeto es aproximadamente 2×10^6 células/kg, aproximadamente 3×10^6 células/kg, aproximadamente 4×10^6 células/kg, aproximadamente 5×10^6 células/kg, aproximadamente 6×10^6 células/kg, aproximadamente 7×10^6 células/kg, aproximadamente 8×10^6 células/kg, aproximadamente 9×10^6 células/kg, o aproximadamente 10×10^6 células/kg, o más células/kg, incluidas todas las dosis de células intervinientes.

En otra modalidad ilustrativa, la cantidad eficaz de células inmunitarias efectoras modificadas proporcionadas a un sujeto es de aproximadamente 2×10^6 células/kg a

aproximadamente 10×10^6 células/kg, aproximadamente 3×10^6 células/kg a aproximadamente 10×10^6 células/kg, aproximadamente 4×10^6 células/kg a aproximadamente 10×10^6 células/kg, aproximadamente 5×10^6 células/kg a aproximadamente 10×10^6 células/kg, 2×10^6 células/kg a aproximadamente 6×10^6 células/kg, 2×10^6 células/kg a aproximadamente 7×10^6 células/kg, 2×10^6 células/kg a aproximadamente 8×10^6 células/kg, 3×10^6 células/kg a aproximadamente 6×10^6 células/kg, 3×10^6 células/kg a aproximadamente 7×10^6 células/kg, 3×10^6 células/kg a aproximadamente 8×10^6 células/kg, 4×10^6 células/kg a aproximadamente 6×10^6 células/kg, 4×10^6 células/kg a aproximadamente 7×10^6 células/kg, 4×10^6 células/kg a aproximadamente 8×10^6 células/kg, 5×10^6 células/kg a aproximadamente 6×10^6 células/kg, 5×10^6 células/kg a aproximadamente 7×10^6 células/kg, 5×10^6 células/kg a aproximadamente 8×10^6 células/kg, o 6×10^6 células/kg a aproximadamente 8×10^6 células/kg, incluidas todas las dosis de células intervinientes.

Un experto en la técnica reconocería que pueden ser necesarias múltiples administraciones de las composiciones contempladas en modalidades particulares para efectuar la terapia deseada. Por ejemplo, una composición puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 o más veces durante un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5, años, 10 años, o más.

En determinadas modalidades, puede ser deseable administrar células T activadas a un sujeto y luego posteriormente volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar células T de esta, y reinfundir al paciente con estas células T activadas y expandidas. Este proceso se puede llevar a cabo varias veces cada pocas semanas. En determinadas modalidades, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinadas modalidades, las células T se activan a partir de extracciones de sangre de 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 100cc, 150cc, 200cc, 250cc, 300cc, 350cc, o 400cc o más. Sin limitarse a la teoría, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar determinadas poblaciones de células T.

En una modalidad, un método para tratar a un sujeto diagnosticado con un cáncer, comprende eliminar células inmunitarias efectoras del sujeto, modificar las células inmunitarias efectoras mediante la introducción de uno o más vectores que codifican un TCR de MAGEA4 o eTCR de MAGEA4 y un receptor de TGF β quimérico y producir una población de células inmunitarias efectoras modificadas, y administrar la población de células inmunitarias efectoras modificadas al mismo sujeto. En una modalidad preferida, las células inmunitarias efectoras comprenden células T.

Los métodos para administrar las composiciones celulares contempladas en modalidades particulares incluyen cualquier método que sea eficaz para dar como resultado la reintroducción de células inmunitarias efectoras modificadas *ex vivo* o en reintroducción de los progenitores modificados de células inmunitarias efectoras que, tras la introducción en un sujeto, se diferencian en células inmunitarias efectoras maduras. Un método comprende modificar las células T de sangre periférica *ex vivo* mediante la introducción de uno o más vectores que codifican un TCR de MAGEA4 o un eTCR de MAGEA4 y un receptor de TGF β quimérico y devolver las células transducidas al sujeto.

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, y patentes emitidas citadas en esta descripción se incorporan en la presente descripción como si cada publicación individual, solicitud de patente, o patente emitida se indicaran específicamente e individualmente para incorporarse como referencia.

Aunque las modalidades anteriores se han descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica en vista de las indicaciones contempladas en la presente descripción que determinados cambios y modificaciones pueden hacerse a la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente a modo de

ilustración y no de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

LAS CÉLULAS T CON TCR DE MAGEA4 QUE EXPRESAN UN CONVERTIDOR DE SEÑAL TGF β
TRANSDUCEN UNA SEÑAL DE IL-12 Y SECRETAN UN AUMENTO DEL IFN γ EN RESPUESTA A MAGEA4 Y
TGF β 1

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano se activaron con anti-CD3 (50 ng/ml) y anti-CD28 (50 ng/ml) solubles y se transdujeron (MOI=20) con vectores lentivíricos (LVV) que expresan (i) un TCR de MAGEA4 (p. ej., SEQ ID NO: 4), o (ii) un TCR de MAGEA4 y un convertidor de señal de TGF β quimérico que responde a IL-12 (CTBR12), p. ej., SEQ ID NO: 4 y 8, codificada en vectores separados. Después de 10 días de cultivo en medios que contenían IL2, se recolectó el producto celular para análisis *in vitro* y se crioconservó.

Señalización CTBR12

La señalización de la IL-12 implica la dimerización del receptor y la activación de STAT4 mediante fosforilación. Se evaluó la fosforilación de STAT4 en respuesta al TGF β . También se evaluó la fosforilación de Smad2/3 para verificar que el CTBR12 bloquea la señalización de TGF β nativa. Una célula T con TCR de MAGEA4 y una célula T de TCR/CTBR12 de MAGEA4 descansaron toda la noche en medios sin suero, después se expusieron a TGF β 1 (10 ng/ml) durante 20 minutos. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anti-phospho-Smad2/3 (pS465/467) y phospho-STAT4 (pY693). El CTBR12 bloqueó la fosforilación de Smad2/3 y STAT4 activado en células T que expresan los TCR de MAGEA4 (Figura 1, la mayoría de los paneles de la derecha). Estos datos indican que el CTBR12 puede bloquear la señalización del TGF β nativo y transducir una señal de IL-12 cuando se coexpresa con un TCR de MAGEA4 .

Señalización de TCR de MAGEA4

Los TCR funcionales secretan IFN γ en respuesta al antígeno, y la secreción puede mejorarse mediante la señalización de la IL-12. Células T no transducidas (UTD), células T con TCR de MAGEA4, y células T con TCR/CTBR12 de MAGEA4 se cultivaron con células tumorales A375 MAGEA4⁺ en una relación E:T de 1:1 durante 24 horas en presencia o ausencia del TGF β 1 (10 ng/ml). Después de 24 horas, se determinó la cantidad de IFN γ secretado en el medio. Las células T con TCR/CTBR12 de MAGEA4 produjeron cantidades significativamente mayores de IFN γ en presencia de TGF β 1 en comparación con todas las demás condiciones de tratamiento o control. Figura 2. Estos datos demuestran que la expresión de CTBR12 en las células T con TCR de MAGEA4 protege contra la inmunosupresión del TGF β y promueve la función efectora mejorada *in vitro*.

EJEMPLO 2

LA EXPRESIÓN DE CTBR12 MEJORA LA EFICACIA *IN VIVO* DE LAS CÉLULAS T CON TCR DE MAGEA4

Se usó un modelo de xenoinjerto de ratón NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) para evaluar si la expresión de CTBR12 mejora la eficacia *in vivo* de las células T con TCR de MAGEA4. Los ratones NSG se implantaron con células tumorales A375 MAGEA4⁺ por vía subcutánea. El volumen del tumor se midió dos veces por semana mediante calibrador y se calculó usando la fórmula Volumen del tumor = Longitud x Ancho x Altura x 0.52. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 50 mm³, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 0,625 x 10⁶ células T UTD, 0.625x10⁶ células T con TCR de MAGEA4 de tetrámero positivo GYV, o 0.625x10⁶ células T con TCR/CTBR12 de MAGEA4 de tetrámero positivo GYV. Las células T con TCR/CTBR12 de MAGEA4 controlan el volumen del tumor significativamente mejor que las células T con TCR de MAGEA4 o las células T de UTD de control. Figura 3. Estos datos muestran que la expresión de CTBR12 mejora la eficacia *in vivo* de las células T con TCR de MAGEA4.

EJEMPLO 3

LAS CÉLULAS T CON TCR DE MAGEA4 MEJORADAS QUE EXPRESAN UN CONVERTIDOR DE SEÑAL TGF β TRANSDUCEN UNA SEÑAL DE IL-12 Y SECRETAN UN AUMENTO DEL IFN γ EN RESPUESTA A MAGEA4 Y TGF β 1

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano se activaron con anti-CD3 (50 ng/ml) y anti-CD28 (50 ng/ml) solubles y se transdujeron (MOI=20) con vectores lentivíricos (LVV) que expresan (i) un TCR mejorado por emparejamiento de MAGEA4 (eTCR), (p. ej., SEQ ID NO: 7), o (ii) un eTCR de MAGEA4 y un receptor de CTBR12 (p. ej., SEQ ID NO: 7 y 8) codificado en el mismo vector. Después de 10 días de cultivo en medios que contenían IL2, se recolectó el producto celular para análisis *in vitro* y se crioconservó.

Señalización CTBR12

La señalización de la IL-12 implica la dimerización del receptor y la activación de STAT4 mediante fosforilación. Se evaluó la fosforilación de STAT4 en respuesta al TGF β . También se evaluó la fosforilación de Smad2/3 para verificar que el CTBR12 bloquea la señalización de TGF β nativa. Una célula T con eTCR de MAGEA4 y una célula T de eTCR/CTBR12 de MAGEA4 descansaron toda la noche en medios sin suero, después se expusieron al TGF β 1 (10 ng/ml) durante 20 minutos. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anti-phospho-Smad2/3 (pS465/467) y phospho-STAT4 (pY693). El CTBR12 bloqueó la fosforilación de Smad2/3 y activó STAT4 en células T que expresan los eTCR de MAGEA4 (Figura 4, la mayoría de los paneles de la derecha). Estos datos indican que el CTBR12 puede bloquear la señalización del TGF β nativo y transducir una señal de IL-12 cuando se coexpresa con un eTCR de MAGEA4.

Señalización de TCR de MAGEA4

Los TCR funcionales secretan IFN γ en respuesta al antígeno, y la secreción puede mejorarse mediante la señalización de la IL-12. Células T no transducidas (UTD), células T con

eTCR de MAGEA4, y células T con eTCR/CTBR12 de MAGEA4 se cultivaron con células tumorales A375 MAGEA4⁺ en una relación E:T de 1:1 durante 24 horas en presencia o ausencia del TGFβ1 (10 ng/ml). Después de 24 horas, se determinó la cantidad de IFNγ secretado en el medio. El tratamiento con TGFβ1 suprimió la secreción de IFNγ por las células T con eTCR de MAGEA4 y mejoró la secreción de IFNγ por las células T con eTCR/CTBR12 de MAGEA4. Figura 5. Estos datos demuestran que la expresión de CTBR12 en las células T con eTCR de MAGEA4 protege contra la inmunosupresión del TGFβ y promueve la función efectora mejorada *in vitro*.

En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos usados no deben interpretarse de para limitar las reivindicaciones a las modalidades específicas descritas en la descripción y las reivindicaciones, pero deben interpretarse para incluir todas las modalidades posibles junto con el alcance completo de los equivalentes a los que tales reivindicaciones tienen derecho. En consecuencia, las reivindicaciones no se limitan por la descripción.



**Superintendencia de
Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0016480
Recibo: 25-161160
Fecha: 03/07/2025

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 1130718
CUS: 1601065257

Patente PCT
CÉLULAS T GENOMODIFICADAS

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 225,000	\$ 225,000
TOTAL					\$ 225,000