PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS DE MAGEA1, PROTEÍNAS DE UNIÓN QUE RECONOCEN LOS PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS DE MAGEA1 Y USOS DE LOS MISMOS

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º de serie 63/546,105, presentada el 27 de octubre de 2023, y la solicitud provisional estadounidense n.º de serie 63/554,734, presentada el 16 de febrero de 2024; los contenidos completos de cada solicitud se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células (ACT) usando células T modificadas presenta una gran eficacia en el tratamiento de determinados tipos de tumores líquidos y es promisoria para el tratamiento de tumores sólidos. Las células T modificadas con receptores de células T (TCR-T) son células T que expresan un TCR exógeno que reconoce al antígeno que existe en las células cancerosas. La interacción de TCR-antígeno es el componente central del mecanismo de direccionamiento que permite que las células T-TCR maten a las células cancerosas. Uno de los desafíos para el ensayo y la adopción en general de una terapia con TCR-T es la falta de pares de TCR-antígeno que se pueden aplicar a un amplio rango pacientes e indicaciones.

Además, la cantidad de antígenos buscados es limitada debido a la dificultad de descubrir nuevos pares de TCR-antígeno, lo cual habitualmente requiere la predicción del epítopo presentado al MHC. Sin embargo, dichos epítopos pueden no ser inmunogénicos, lo cual dificulta la identificación de un TCR reactivo, o es posible que el epítopo no sea procesado y presentado fisiológicamente por las células cancerosas. Por lo tanto, existe una gran necesidad en el arte de identificar pares de TCR-antígeno en el contexto de una variedad de alelos de HLA de aplicación amplia con el fin de desarrollar reactivos útiles para diagnosticar, pronosticar, tratar y seleccionar agentes relevantes para los trastornos caracterizados por la expresión de los antígenos.

Compendio de la invención

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de péptidos inmunogénicos MAGEA1 y proteínas de unión que reconocen dichos péptidos inmunogénicos MAGEA1 en base a pruebas funcionales no sesgadas usadas para descubrir el antígeno de

los clonotipos de TCR identificados en los sujetos que padecen trastornos asociados con la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, sujetos que tienen un melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma de mama invasivo o carcinoma urotelial de vejiga). Los TCR identificados reconocieron los péptidos inmunogénicos MAGEA1, tales como los que se enumeran en la Tabla 1, en el contexto de una variedad de alelos de HLA (por ejemplo, HLA-A*01:01, que se expresa en aproximadamente el 24 % de la población estadounidense). En la presente se demuestra que MAGEA1 se expresa selectivamente en tejidos cancerosos y de testículo, pero no en los tejidos somáticos normales, lo que lo vuelve una diana ideal para la ACT. La capacidad de las proteínas de unión a MAGEA1 (por ejemplo, los TCR que se describen en la presente) de unirse a los péptidos inmunogénicos MAGEA1 y generar respuestas inmunológicas que matan a las células que expresan MAGEA1 (por ejemplo, células cancerosas) demuestra la utilidad de dichas proteínas de unión en una diversidad de usos, inclusive métodos de diagnóstico, pronóstico, tratamiento y selección de agentes relevantes para los trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1.

El descubrimiento de TCR específicos del epítopo $MAGEA1_{161-169}$ presentados en HLA A01:01 fue particularmente desafiante y los resultados fueron inesperados. En particular, la cantidad de donantes disponibles de los cuales células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para identificar TCR específicos de HLA-A*01:01 es limitada ya que la frecuencia de expresión del alelo HLA-A*01:01 es solamente alrededor del 24 % de la población estadounidense. También se determinó empíricamente que las frecuencias de clones de células T son dramáticamente más raras para HLA-A*01:01 (por ejemplo, 1 clon por 5E6 células T no activados) en comparación con otros alelos HLA, tales como un HLA-A*02:01 que tiene una frecuencia de clon de más de 20 clones por 5E6 células T no activados. Por consiguiente, fue necesario realizar un análisis más importante de los donantes y las células T con respecto a otros alelos de HLA con el fin de identificar los TCR específicos del candidato HLA-A*01:01. Incluso entre TCR específicos para HLA-A*01:01, se determinó adicionalmente de forma empírica que pocos tienen una función citotóxica. Por ejemplo, como se describe adicionalmente más adelante, un análisis funcional de 200 TCR específicos para el epítopo restringido para $MAGEA1_{161-169}$ HLA*01:01 reveló 0 TCR citotóxicos y fue necesario realizar un análisis adicional de 1181 TCR para identificar 5 TCR fuertemente citotóxicos. Por

contraste, el análisis funcional de 200 TCR candidatos específicos para péptidos restringidos a otros HLA tienen como resultado, típicamente, rendimientos mucho mayores de TCR citotóxicos (por ejemplo, análisis funcional de 200 TCR candidatos para un epítopo HLA-A*02:01 identificó 30 TCR fuertemente citotóxicos). Además, incluso menos TCR MAGEA1$_{161-169}$ mostró una avidez favorable, tal como un ensayo de dilución en serie de péptidos. Ver también Chakraborty *et al*. (2004) *Hum. Immunol.* 65:794-802; Podaza *et al.* (2020) *Front. Immunol.* 11:1147; y Traversari *et al*. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1453-1457.

En un aspecto, se provee un péptido inmunogénico que comprende un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1.

En otro aspecto, se provee un péptido inmunogénico que consiste en un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el péptido inmunogénico deriva de una proteína MAGEA1, opcionalmente en donde el péptido inmunogénico es de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud. En otra forma de realización, el péptido inmunogénico puede generar una respuesta inmunológica contra MAGEA1 y/o células que expresan MAGEA1 en un sujeto, opcionalmente en donde la respuesta inmunológica i) es una respuesta de células T y/o una respuesta de células T CD8+ y/o ii) se selecciona del grupo que consiste en expansión de células T (por ejemplo, proliferación), liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica.

En aún otro aspecto, se provee una composición inmunogénica que comprende por lo menos un péptido inmunogénico descrito en la presente.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante. En otra forma de realización, la composición inmunogénica puede generar una respuesta inmunológica contra MAGEA1 y/o células que expresan MAGEA1 en un sujeto, opcionalmente en donde la respuesta inmunológica i) es una respuesta de células T y/o una respuesta de células T CD8+ y/o ii) se selecciona del grupo

que consiste en expansión de células T (por ejemplo, proliferación), liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica.

En aún otro aspecto, se provee una composición que comprende un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1, y una molécula de MHC.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, la molécula de MHC es un multímero de MHC, opcionalmente donde dicho multímero de MHC es un tetrámero. En otra forma de realización, la molécula de MHC es una molécula de MHC de clase I. En una modalidad aún adicional, la molécula de MHC comprende una cadena alfa MHC que es un serotipo de HLA de HLA-A*01, opcionalmente donde el alelo de HLA es HLA-A*01:01.

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

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, la molécula de MHC es un multímero de MHC, opcionalmente donde dicho multímero de MHC es un tetrámero. En otra forma de realización, la molécula de MHC es una molécula de MHC de clase I. En aún otra forma de realización, la molécula de MHC comprende una cadena alfa de MHC que es de un serotipo de HLA de HLA-A*01, opcionalmente donde el alelo HLA es HLA-A*01:01. En aún otra forma de realización, el epítopo peptídico y la molécula del MHC están unidos de manera covalente y/o en donde las cadenas alfa y beta de la molécula del MHC están unidas de manera covalente. En otra forma de realización, el complejo de MHC-péptido estable comprende una marca detectable, opcionalmente en donde la marca detectable es un fluoróforo.

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

En aún otro aspecto, se provee un ácido nucleico aislado que codifica un péptido inmunogénico descrito en la presente, o un complemento del mismo.

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

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

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

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

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, las células T son células T CD8+. En otra forma de realización, la detección y/o determinación se lleva a cabo usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), mediante inmunoquímica, transferencia Western o un ensayo de flujo intracelular. En aún otra forma de realización, una muestra comprende células T que estuvieron en contacto o sospechadas de haber estado en contacto con una o más proteínas MAGEA1 o fragmentos de las mismas.

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

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

En otro aspecto, se provee un método para evaluar la eficacia de una terapia para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 que comprende: a) determinar la presencia o el nivel de reactividad entre las células T obtenidas del sujeto y uno más péptidos inmunogénicos descritos en la presente o uno o más complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente, en una primera muestra obtenida del sujeto antes de proveer por lo menos una parte de la terapia al sujeto, y b) determinar la presencia o el nivel de reactividad entre dichos uno más péptidos inmunogénicos descritos en la presente, o dichos uno o más complejos de MHC-péptido estables descritos en la presente, y las células T obtenidas del sujeto presentes en una segunda muestra obtenida del sujeto después de proveer la terapia al sujeto, en donde la presencia o un mayor nivel de reactividad en la segunda muestra, con relación a la primera muestra, es indicativo de que la terapia es eficaz para el tratamiento del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el nivel de reactividad está indicado por a) la presencia de unión y/o b) la activación y/o la función

efectora de células T, opcionalmente en donde la activación o función efectora de las células T es la proliferación, la citotoxicidad o la liberación de citoquinas de las células T. En otra forma de realización, el método comprende además repetir los pasos a) y b) en un punto de tiempo subsiguiente, opcionalmente en donde el sujeto ha recibido tratamiento para aliviar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 entre el primer punto de tiempo y el punto de tiempo subsiguiente. En aún otra forma de realización, la unión, activación y/o función efectora de células T se detecta usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo de inmunoabsorción unida a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), mediante inmunoquímica, transferencia Western o un ensayo de flujo intracelular. En aún otra forma de realización, el nivel de control es un número de referencia. En otra forma de realización, el nivel de control es el nivel de un sujeto que no padece el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

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

En aún otro aspecto, se provee un método para identificar una molécula de unión a péptido, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que se une a un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1 que comprende: a) proveer una célula que presenta un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1 en el contexto de una molécula de MHC sobre la superficie de la célula; b) determinar la unión de una pluralidad de moléculas de unión a péptido candidatas, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, al epítopo peptídico en el contexto de la molécula de MHC sobre la célula; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptido, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, que se unen al epítopo peptídico en el contexto de la molécula de MHC.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el paso a) comprende poner la molécula de MHC sobre la superficie de la célula en contacto con un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1. En otra forma de realización, el paso a) comprende expresar el epítopo peptídico

seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1 en la célula usando un vector que comprende una secuencia heteróloga que codifica el epítopo peptídico.

En otro aspecto, se provee un método para identificar una molécula de unión a péptido, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que se une a un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1 que comprende: a) proveer un epítopo peptídico ya sea solo o en un complejo de MHC-péptido estable, que comprende un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1, ya sea solo o en el contexto de una molécula de MHC; b) determinar la unión de una pluralidad de moléculas de unión a péptido candidatos, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, al péptido o complejo de MHC-péptido estable; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptido, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, que se unen al epítopo peptídico o al complejo de MHC-péptido estable, opcionalmente en donde el MHC o el complejo de MHC-péptido es como se describe en la presente.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, una pluralidad de moléculas de unión a péptido candidatas comprende un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígeno quimérico (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector. En otra forma de realización, la pluralidad de moléculas de unión a péptido candidato comprende por lo menos 2, 5, 10, 100, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 o más, moléculas de unión a péptido candidatas diferentes. En aún otra forma de realización, la pluralidad de moléculas de unión a péptido candidato comprende una o más moléculas de unión a péptido candidato que se obtienen de una muestra de un sujeto o de una población de sujetos; o la pluralidad de moléculas de unión a péptido candidato comprende una o más moléculas de unión a péptido candidato que comprenden mutaciones en una molécula de unión a péptido del andamiaje parental obtenida de una muestra de un sujeto. En aún otra forma de realización, un sujeto o una población de sujetos a) no padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o se ha recuperado de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, o b) padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En otra forma de realización, al sujeto o la población de sujetos se le

ha administrado una composición descrita en la presente. En aún otra forma de realización, el sujeto es un modelo de animales de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o un mamífero, opcionalmente en donde el mamífero es un ser humano, un primate o un roedor. En aún otra forma de realización, el sujeto es un modelo de animales de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, un ratón transgénico para HLA y/o un ratón transgénico para un TCR humano. En otra forma de realización, la muestra comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células T y/o células T CD8+ de memoria.

En aún otro aspecto, se provee una molécula de unión a péptido o un fragmento de unión a antígeno de la misma, identificada de acuerdo con un método descrito en la presente, opcionalmente en donde la molécula de unión a péptido, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígeno quimérico (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector.

En aún otro aspecto, se provee un método de tratamiento de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células T modificadas genéticamente que expresan una molécula de unión a péptido, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que i) se une a un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias que se enumeran en la Tabla 1, ii) se identifica de acuerdo con un método descrito en la presente y/o iii) se une a un complejo de MHC-péptido estable que comprende un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias que se enumeran en la Tabla 1 en el contexto de una molécula de MHC, opcionalmente en donde la molécula de unión a péptido, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un TCR de cadena simple (scTCR), un receptor de antígeno quimérico (CAR) o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector, opcionalmente en donde el MHC o el complejo de MHC-péptido es como se describe en la presente.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de

realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, las células T se aíslan a) del sujeto, b) de un donante que no padece el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 o c) de un donante que se ha recuperado de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

En otro aspecto, se provee un método de tratamiento de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto que comprende la transfusión de células T específicas del antígeno al sujeto, en donde las células T específicas del antígeno se generan mediante: a) estimulación de células inmunológicas de un sujeto con una composición descrita en la presente; y b) expansión de células T específicas del antígeno *in vitro* o *ex vivo*, opcionalmente i) aislamiento de células inmunológicas del sujeto antes de estimular las células inmunológicas y/o ii) en donde las células inmunológicas comprenden PBMC, células T, células T CD8+, células T naive, células T de memoria central y/o células T de memoria efectoras.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el contacto de los agentes se lleva a cabo en condiciones y por un tiempo adecuados para la formación de por lo menos un complejo inmunológico entre el epítopo peptídico, el péptido inmunogénico, el complejo de MHC-péptido estable, un receptor de células T y/o células inmunológicas. En otra forma de realización, el epítopo peptídico, el péptido inmunogénico, el complejo de MHC-péptido estable y/o el receptor de células T son expresados por células y las células se expanden y/o se aíslan en uno o más pasos. En aún otra forma de realización, el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es un cáncer o una recaída del mismo, opcionalmente en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma de mama invasivo y carcinoma urotelial de vejiga. En aún otra forma de realización, el sujeto es un modelo de animales de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o un mamífero, opcionalmente en donde el mamífero es un ser humano, un primate o un roedor.

En aún otro aspecto, se provee una proteína de unión que se une a un polipéptido que comprende una secuencia de un péptido inmunogénico descrita en la presente, un péptido

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

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, una proteína de unión comprende: a) una secuencia de CDR de la cadena alfa del receptor de células T (TCR) que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de CDR de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena alfa de un TCR que se enumeran en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de CDR de la cadena beta de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de CDR de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 2, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $5x10^{-4}$ M. En otra forma de realización, una proteína de unión comprende: a) una secuencia del dominio variable (V_α) de la cadena alfa de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia del dominio V_α de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominios V_α de un TCR que se enumeran en la Tabla 2; y/o b) una secuencia del dominio variable (V_β) de la cadena beta de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia del dominio V_β de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominios V_β de un TCR que se enumeran en la Tabla 2, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $5x10^{-4}$ M. En aún otra forma de realización, una proteína de unión comprende: a) una secuencia de la cadena alfa de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena alfa de un TCR que se

enumeran en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de la cadena beta de un TCR que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad con una secuencia de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 2, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $5x10^{-4}$ M. En aún otra forma de realización, una proteína de unión comprende: a) una secuencia de CDR de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena alfa de un TCR que se enumeran en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de CDR de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 2, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $5x10^{-4}$ M. En aún otra forma de realización, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia de un dominio variable (V_α) de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominios V_α de un TCR que se enumeran en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de un dominio variable (V_β) de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de dominios V_β de un TCR que se enumeran en la Tabla 2, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $5x10^{-4}$ M. En otra forma de realización, se provee una proteína de unión que comprende: a) una secuencia de la cadena alfa de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena alfa de un TCR que se enumeran en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de la cadena beta de un TCR seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 2, en donde la proteína de unión tiene la capacidad para unirse a un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), opcionalmente en donde la afinidad de unión tiene un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $5x10^{-4}$ M. En otra forma de realización, 1) la CDR de la cadena alfa de un TCR, el dominio V_α de un TCR y/o una cadena alfa de un TCR están codificados por un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC, o un fragmento de los mismos, seleccionados del grupo de genes

TRAV, TRAJ y TRAC que se enumeran en la Tabla 2, y/o 2) la CDR de la cadena beta de un TCR, el dominio V_β de un TCR y/o la cadena beta de un TCR están codificados por un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC, o un fragmento de los mismos, seleccionados del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC que se enumeran en la Tabla 2, y/o 3) cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos, o una combinación de las mismas, en comparación con la secuencia de CDR de referencia conocida que se enumera en la Tabla 2. En aún otra forma de realización, una proteína de unión comprende un dominio de unión que tiene un dominio transmembrana y un dominio efector que es intracelular. En otra forma de realización, la cadena alfa de un TCR y la cadena beta de un TCR están unidas de manera covalente, opcionalmente en donde la cadena alfa de un TCR y la cadena beta de un TCR están unidas de manera covalente por medio de un péptido conector. En aún otra forma de realización, la cadena alfa de un TCR y/o la cadena beta de un TCR están unidas de manera covalente a una unidad, opcionalmente en donde dicha unidad unida de manera covalente comprende una marca o una etiqueta de afinidad. En aún otra forma de realización, la marca de afinidad se selecciona del grupo que consiste en una marca de enriquecimiento de CD34, la glutatión-S-transferasa (GST), la proteína de unión a calmodulina (CBP), una marca de proteína C, una marca Myc, una marca Halo, una marca HA, una marca Flag, una marca His, una marca de biotina y una marca V5, y/o en donde la etiqueta es una proteína fluorescente. En otra forma de realización, la unidad unida de manera covalente se selecciona del grupo que consiste en un agente inflamatorio, una citoquina, una toxina, una molécula citotóxica, un isótopo radioactivo o un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En aún otra forma de realización, la proteína de unión se une al complejo pMHC sobre una superficie celular. En aún otra forma de realización, el MHC o el complejo de MHC-péptido es el que se describe en la presente. En otra forma de realización, la unión de una proteína de unión al complejo de péptido MAGEA1-MHC (pMHC) genera una respuesta inmunológica, opcionalmente en donde la respuesta inmunológica es i) una respuesta de células T y/o una respuesta de células T CD8+ y/o ii) se selecciona del grupo que consiste en expansión de células T, liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica. En aún otra forma de realización, la proteína de unión se puede unir de manera específica y/o selectiva a un complejo del péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC) con un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $1x10^{-4}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-5}$ M,

menor o igual a aproximadamente $1x10^{-5}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-6}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-6}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-7}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-7}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-8}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-8}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-9}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-9}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-10}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-10}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-11}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-11}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-12}$ M o menor o igual a aproximadamente $1x10^{-12}$ M. En otra forma de realización, una proteína de unión induce una mayor expansión de células T, liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica que un receptor de células T conocido cuando se pone en contacto con células diana con una expresión heterocigota de MAGEA1, opcionalmente en donde la inducción es por lo menos 1,05 veces mayor. Tal como se usa en la presente, la referencia a las veces de cambio que, en algunas formas de realización, puede comprender la comparación con cualquier modalidad de referencia de interés, tal como una comparación con una proteína de unión diferente; la comparación con la misma proteína de unión en un contexto de expresión semejante diferente de la misma proteína de unión en una célula inmunológica diferente, a un nivel diferente, en combinación con otros agentes que se describen en la presente; y semejantes. En aún otra forma de realización, la muerte citotóxica es de una célula cancerosa diana. En aún otra forma de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma de mama invasivo y carcinoma urotelial de vejiga. En otra modalidad, una proteína de unión no se une a un complejo péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítopo de péptido MAGEA10, MAGEA11, RPS6KA2, RPS6KA3, RPS6KA6, STIL, TECPR1, WDR45, CCDC168, SIRPB1, TENM1, ADAMTS20, CPO, SPATA22, y/o ZNF202 (por ejemplo, un epítopo EVDPTGHSF MAGEA10, un epítopo EVDPTSHSY MAGEA11, un epítopo KEDIGVGSYSVCKRC RPS6KA2, un epítopo KEDIGVGSYSVCKRC RPS6KA3 epítopo, un epítopo KEDIGVGSYSVCKRC RPS6KA6, un epítopo QVQGTYKYGYLTMDETRKLLLL STIL, un epítopo CTKAGTKPPSLQWAWVSDWFVDFSVPGGTDQEGWQYASDFPASYHGSKTMKDFVRRRCW ARKCKLVT TECPR1, un epítopo GTSSAPFTINAHQSDIACVSLNQPGTVVASASQKGTLIRLFDTQSKEKLVELRRGTDPATLYCI

NFS WDR45, un epítopo MWQGENVADTFPNTTSFTPDSSDIKRQSGFQTEIDMRISGLSHTQPTQIESLAEGIARYSDPID KRRTSNLVKGAKLHDRESGEEKQEHL CCDC268, un epítopo TVSDLTKRNNMDFSIRISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDHVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVS GPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDIT SIRPB1, un epítopo PPTHTQFDFVKLMDGKQLVKQDSKGSDDTQHSPRNLILTSLQETGFIEYMDQGPWYLAFYND GKKMEQVFVLTTAIEIMDDCSTNCNGNG TENM1, un epítopo VFSKIRIDLTSMQIKTTDLLFSKTIFGNAVPFATAGDCYSAFRCPQGQFSINLSGTGMKISSTAK WLTQGSYTSVSIRRSEDGTRFFGKC ADAMTS20, un epítopo TWTTDRLWRKSRSPHNNGTCFGTDLNRNFNASWCSIGASRNCQDQTFCGTGPVSEPETKA VASFIESKKDDILCFLTMHSYGQLILTPYG CPO, un epítopo MKRSLNENSARSTADWAWEAVNPELAPVMKTVDTGQIPHSVSRPLRSQDSVFNSIQSNTGR SQGGWSYRDGNKNTSLKTWNKNDFKPQCK SPATA22 y/o un epítopo VALLTALSQGLVTFKDVAVCFSQDQWSDLDPTQKEFYGEYVLEED ZNF202.

Estos genes son ampliamente conocidos y se reconocen por tener anotaciones de acuerdo con los siguientes números de ID del gen de NCBI, cada uno de los cuales se encuentra disponible en internet en ncbi.nlm.nih.gov/gene:

ZNF202: ID del gen 7753 y NM_001301779.2 y NP_001288708.1, NM_001301780.2 y NP_001288709.1, NM_001301819.1 y NP_001288748.1, y NM_003455.4 y NP_003446.2 como clones representativos;

RPS6KA2: ID del gen 6196 y NM_001006932.3 y NP_001006933.3, NM_001318936.2 y NP_001305865.2, NM_001318937.2 y NP_001305866.1, NM_001318937.2 y NP_001305866.1, and NM_021135.6 y NP_066958.2 como clones representativos;

RPS6KA3: ID del gen 6197 y NM_004586.3 y NP_004577.1 como clones representativos;

RPS6KA6: ID del gen 27330 y NM_001330512.1 y NP_001317441.1; y NM_014496.5 y NP_055311.1 como clones representativos;

MAGEA11: ID del gen 4110 y NM_014496.5 y NP_055311.1; y NM_014496.5 y NP_055311.1 como clones representativos;

MAGEA10: ID del gen 4109 y NM_001011543.3 y NP_001011543.3; NM_001251828.2 y NP_001238757.2; y NM_021048.5 y NP_066386.3 como clones representativos;

WDR45: ID del gen 11152 y NM_001029896.2 y NP_001025067.1; y NM_001029896.2 y

NP_001025067.1 como clones representativos;

TECPR1: ID del gen 25851 y NM_015395.3 y NP_056210.1 como clones representativos;

CCDC168: ID del gen 643677 y NM_001146197.3 y NP_001139669.1 como clones representativos;

SIRPB1: ID del gen 10326 y NM_001083910.4 y NP_001077379.1; NM_001135844.4 y NP_001129316.1; NM_001329157.2 y NP_001316086.1; NM_001330639.2 y NP_001317568.1; NM_006065.5 y NP_006056.2 como clones representativos;

TENM1: ID del gel 10178 y NM_001163278.2 y NP_001156750.1; NM_001163279.1 y NP_001156751.1; y NM_014253.3 y NP_055068.2 como clones representativos;

ADAMTS20: ID del gen 80070 y NM_025003.5 y NP_079279.3 como clones representativos;

CPO: ID del gen 130749 y NM_173077.3 y NP_775100.1 como clones representativos;

SPATA22: ID del gen 84690 y NM_001170695.2 y NP_001164166.1; NM_001170696.2 y NP_001164167.1; NM_001170697.2 y NP_001164168.1; NM_001170698.2 y NP_001164169.1; NM_001170699.2 y NP_001164170.1; NM_001321336.2 y NP_001308265.1; NM_001321337.2 y NP_001308266.1; y NM_032598.5 y NP_115987.2 como clones representativos; y

STIL: ID del gen 6491 y NM_001048166.1 y NP_001041631.1; NM_001282936.1 y NP_001269865.1; NM_001282937.1 y NP_001269866.1; NM_001282938.1 y NP_001269867.1; NM_001282939.1 y NP_001269868.1; NM_001377417.1 y NP_001364346.1; y NM_003035.2 y NP_003026.2 como clones representativos.

En aún otro aspecto, se provee una cadena alfa y/o una cadena beta de un TCR que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de la cadena alfa y de la cadena beta de un TCR que se enumeran en la Tabla 2.

En otro aspecto, se provee una molécula de ácido nucleico aislada i) que se hibridiza, en condiciones severas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en la Tabla 2, ii) una secuencia que presenta por lo menos aproximadamente 80% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en la Tabla 2, y/o iii) una secuencia que presenta por lo menos aproximadamente 80% de homología con un ácido nucleico que

codifica las secuencias que se enumeran en la Tabla 2, opcionalmente en donde la molécula de ácido nucleico aislada comprende 1) un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC, o un fragmento de los mismos, seleccionados del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC que se enumeran en la Tabla 2 y/o 2) un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC, o un fragmento de los mismos, seleccionados del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC que se enumeran en la Tabla 2.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el ácido nucleico es de codones optimizados para la expresión en una célula huésped.

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

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, un vector comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8α, CD8β, un receptor de TGFβ II dominante negativo (DN-TGFβRII), un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es dihidrofolato reductasa (DHFR). En otra forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8α, CD8β, DN-TGFβRII y/o el marcador de proteínas seleccionable está ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica una marca. En aún otra forma de realización, un ácido nucleico que codifica una marca se encuentra 5’ corriente arriba con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8α, CD8β, el DN-TGFβRII y/o la proteína seleccionable de manera tal que la marca se fusiona con el extremo N-terminal de CD8α, CD8β, el DN-TGFβRII y/o el marcador de proteínas seleccionable. En aún otra forma de realización, la marca es una marca de enriquecimiento en CD34. En otra forma de realización, un ácido nucleico aislado que se describe en la presente, ya sea solo o en combinación con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8α, CD8β, el DN-TGFβRII y/o el marcador de proteínas seleccionable están interconectados con un sitio de entrada a ribosomas interno o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido autoescindible. En aún otra forma de

realización, el péptido autoescindible es P2A, E2A, F2A o T2A.

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

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, la célula huésped comprende el noqueo de un gen cromosómico de un gen TCR, un gen HLA o ambos. En aún otra forma de realización, una célula huésped comprende un noqueo de un gen HLA seleccionado entre un gen de macroglobulina αl, un gen de macroglobulina α2, un gen de macroglobulina α3, un gen de microglobulina β1, un gen de microglobulina β2 y combinaciones de los mismos. En aún otra forma de realización, una célula huésped comprende el noqueo de un gen de un TCR seleccionado entre un gen de la región variable de un TCR α, un gen de la región variable de un TCR β, un gen de una región constante de un TCR y combinaciones de los mismos. En aún otra forma de realización, una célula huésped expresa CD8α, CD8β, un DN-TGFβRII y/o un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde dicho marcador de proteínas seleccionable es DHFR, y además, opcionalmente, en donde el CD8α, CD8β, el DN-TGFβRII y/o el marcador de proteínas seleccionable está fusionado con una marca de enriquecimiento en CD34. En otra forma de realización, las células huésped se enriquecen usando la marca de enriquecimiento en CD34. En aún otra forma de realización, una célula huésped es una célula progenitora hematopoyética, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula sanguínea de cordón umbilical o una célula inmunológica. En aún otra forma de realización, la célula inmunológica es una célula T, un linfocito citotóxico, una célula precursora de linfocitos citotóxicos, una célula progenitora de linfocitos citotóxicos, una célula madre de linfocitos citotóxicos, una célula T $CD4^+$, una célula T $CD8^+$, una célula T doble negativa CD4/CD8, una célula T gamma delta (γδ), una célula asesina natural (NK), una célula T NK, una célula dendrítica o una combinación de las mismas. En aún otra forma de realización, una célula T es una célula T naive, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o una combinación de las mismas. En otra forma de realización, una célula T es una célula T

primaria o una célula de una línea de células T. En aún otra forma de realización, una célula T no expresa o presenta una menor expresión en superficie de un TCR endógeno. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede producir una citoquina o una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende el epítopo de un péptido MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC. En aún otra forma de realización, la célula huésped se pone en contacto con la célula diana *in vitro, ex vivo* o *in vivo.* En aún otra forma de realización, la citoquina es TNF-α, IL-2 y/o IFN-γ. En aún otra forma de realización, una molécula citotóxica comprende perforinas y/o granzimas, opcionalmente en donde la molécula citotóxica es la granzima B. En otra forma de realización, una célula huésped puede producir un nivel más alto de una citoquina o de una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana con una expresión heterocigota de MAGEA1. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede producir un nivel por lo menos 1,05 veces mayor de una citoquina o de una molécula citotóxica. En aún otra forma de realización, una célula huésped puede matar una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítopo del péptido MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC. En otra forma de realización, la muerte se determina mediante un ensayo de muerte celular. En aún otra forma de realización, la relación entre la célula huésped y la célula diana en un ensayo de muerte celular es de entre 20:1 y 1:4. En aún otra forma de realización, una célula diana es una célula diana pulsada con entre 1 µg/ml y 50 pg/ml del péptido MAGEA1, opcionalmente en donde la célula diana es una célula monoalélica para un MHC adaptado al péptido MAGEA1. En otra forma de realización, la célula huésped puede matar a una mayor cantidad de células diana cuando se pone en contacto con células diana con una expresión heterocigota de MAGEA1, opcionalmente en donde la muerte celular es por lo menos 1,05 veces mayor. En aún otra forma de realización, la célula diana es una línea celular o una célula primaria, opcionalmente en donde la célula diana se selecciona del grupo que consiste en una línea celular derivada de HEK293, una línea celular de un cáncer, una célula cancerosa primaria, una línea celular transformada y una línea celular inmortalizada. En aún otra forma de realización, el péptido inmunogénico MAGEA1 es el que se describe en la presente y/o en donde el MHC o el complejo de MHC-péptido es el que se describe en la presente. En otra forma de realización, una célula huésped no induce expansión de células T, liberación de citoquinas o muerte

citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que comprende un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un epítopo peptídico MAGEA10, MAGEA11, RPS6KA2, RPS6KA3, RPS6KA6, STIL, TECPR1, WDR45, CCDC168, SIRPB1, TENM1, ADAMTS20, CPO, SPATA22, y/o ZNF202. En aún otra forma de realización, una célula huésped no expresa el antígeno MAGEA1, no es reconocida por una proteína de unión que se describe en la presente, no es del serotipo HLA-A*01 y/o no expresa un alelo HLA-A*01.

En otro aspecto, se provee una población de las células huésped que se describen en la presente.

En aún otro aspecto, se provee una composición que comprende: a) una proteína de unión descrita en la presente, b) un ácido nucleico aislado descrito en la presente, c) un vector descrito en la presente, d) una célula huésped descrita en la presente y/o e) una población de las células huésped descritas en la presente, y un vehículo.

En aún otro aspecto, se provee un dispositivo o un kit que comprende: a) una proteína de unión descrita en la presente, b) un ácido nucleico aislado descrito en la presente, c) un vector descrito en la presente, d) una célula huésped descrita en la presente y/o e) una población de las células huésped descritas en la presente, donde dicho dispositivo o kit opcionalmente comprende un reactivo para detectar la unión de a), d) y/o e) a un complejo pMHC.

En otro aspecto, se provee un método para producir una proteína de unión descrita en la presente, en donde dicho método comprende los pasos de: (i) cultivar una célula huésped transformada que ha sido transformada mediante un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión; y (ii) recuperar la proteína de unión expresada.

En aún otro aspecto, se provee un método para producir una célula huésped que expresa una proteína de unión descrita en la presente, en donde dicho método comprende los pasos de: (i) introducir un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente en la célula huésped; y (ii) cultivar la célula huésped transformada en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión.

En aún otro aspecto, se provee un método para detectar la presencia o ausencia de un antígeno MAGEA1 y/o de una célula que expresa MAGEA1, opcionalmente en donde la célula es una célula hiperproliferativa, que comprende detectar la presencia o ausencia de dicho

antígeno MAGEA1 en una muestra mediante el uso de por lo menos una proteína de unión descrita en la presente, por lo menos una célula huésped descrita en la presente o una población de células huésped descrita en la presente, en donde la detección del antígeno MAGEA1 es indicativa de la presencia de un antígeno MAGEA1 y/o de una célula que expresa MAGEA1.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, por lo menos una proteína de unión, o por lo menos una célula huésped, forma un complejo con un péptido MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC, y el complejo se detecta mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), mediante inmunoquímica, transferencia Western o un ensayo de flujo intracelular. En otra forma de realización, el método comprende además obtener una muestra de un sujeto.

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

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el nivel control es un número de referencia. En otra forma de realización, el nivel de control es un nivel de un sujeto que no padece el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

En aún otro aspecto, se provee un método para monitorear el progreso de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto, donde dicho método comprende: a) detectar en la muestra de un sujeto la presencia o el nivel de reactividad entre una muestra obtenida del sujeto y por lo menos una proteína de unión descrita en la presente, por lo menos una célula huésped descrita en la presente o una población de células huésped descrita en la

presente; b) repetir el paso a) en un punto de tiempo subsiguiente; y c) comparar el nivel de MAGEA1 o la célula de interés que expresa MAGEA1 detectada en los pasos a) y b) para monitorear el progreso del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto, en donde un nivel de MAGEA1 o de la célula de interés que expresa MAGEA1 detectada en el b) ausente o reducido en comparación con el paso a) indica un progreso inhibido del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto y la presencia o un nivel aumentado de MAGEA1 o de la célula de interés que expresa MAGEA1 detectada en el paso b) en comparación con el paso a) indica que hubo progreso del trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, un sujeto ha recibido tratamiento para tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 entre el primer punto de tiempo y el punto de tiempo subsiguiente.

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

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

descrita en la presente, por lo menos una célula huésped descrita en la presente o una población de células huésped descrita en la presente, en una segunda muestra obtenida del sujeto después de proveer la terapia para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, en donde la ausencia o un nivel reducido de reactividad en la segunda muestra, con relación a la primera muestra, es una indicación de que la terapia es eficaz para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto, y en donde la presencia o un nivel aumentado de reactividad en la segunda muestra, con relación a la primera muestra, es una indicación de que la terapia no es eficaz para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, el nivel de reactividad está indicado por a) la presencia de unión y/o b) la activación y/o la función efectora de células T, opcionalmente en donde la activación o función efectora de células T es la proliferación, la citotoxicidad o la liberación de citoquinas de células T. En otra forma de realización, la unión, activación y/o función efectora de células T se detecta usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo de inmunoabsorción unida a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), mediante inmunoquímica, transferencia Western o un ensayo de flujo intracelular.

En aún otro aspecto, se provee un método de prevención y/o tratamiento de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 que comprende poner células diana que expresan MAGEA1 en contacto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células que expresan por lo menos una proteína de unión descrita en la presente, opcionalmente en donde la composición se administra a un sujeto.

Además, se proveen numerosas formas de realización que se pueden aplicar a cualquier aspecto comprendido en la presente invención y/o combinar con cualquier otra forma de realización descrita en la presente. Por ejemplo, en una forma de realización, una célula es una célula alogénica, una célula singénica o una célula autóloga. En otra forma de realización, la célula es una célula huésped descrita en la presente o una población de células huésped descrita en la presente. En aún otra forma de realización, una célula diana es una célula cancerosa que expresa MAGEA1. En aún otra forma de realización, una composición de

células comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la composición de células induce una respuesta inmunológica contra la célula diana que expresa MAGEA1 en el sujeto. En aún otra forma de realización, la composición de células induce una respuesta inmunológica de células T específica del antígeno contra la célula diana que expresa MAGEA1 en el sujeto. En aún otra forma de realización, una respuesta inmunológica de células T específica del antígeno comprende por lo menos una entre una respuesta de linfocitos T $CD4^+$ auxiliares (Th) y una respuesta de linfocitos T CD8+ citotóxica (CTL). En otra forma de realización, el método comprende además administrar por lo menos un tratamiento adicional para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, opcionalmente en donde dicho por lo menos un tratamiento adicional para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 se administra de manera concurrente o sucesiva con la composición. En aún otra forma de realización, el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es un cáncer o una recaída del mismo, opcionalmente en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma de mama invasivo y carcinoma urotelial de vejiga. En aún otra forma de realización, el sujeto es un modelo de animales de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o un mamífero, opcionalmente en donde el mamífero es un ser humano, un primate o un roedor.

Breve Descripción de las figuras

Algunos Ejemplos y figuras se refieren a algunos TCR de control, como por ejemplo, a) el “Comparador 1” que corresponde a un TCR basado en T-Knife descrito adicionalmente en la presente, tal como en la Tabla 4, b) “Comparador 2”, también conocido como “Comparador”, que corresponde a un TCR basado en Immatics según se describe más adelante en la presente, por ejemplo, en la Tabla 4, así como como b) “Comparador 2”, que corresponde a un TCR basado en T-Knife que se describe de manera más detallada en la presente, por ejemplo, en la Tabla 4 y c) “Comparador 3,” que corresponde a HN-32-41 (es decir, TCR 32-41 HM en la Tabla 2A) de la publicación de patente estadounidense 2023/0270832, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia).

Las **Figuras 1A-1D** muestran una representación esquemática de una plataforma ReceptorScan utilizada para identificar 1181 TCR específicos de MAGEA1 candidatos. La

Figura 1A muestra el sistema de cocultivo. La Figura 1A muestra los resultados de las células T específicos de MAGE-A1 que fueron expandidos a partir de la población de células T CD8 no activados de donantes saludables positivos para A*01:01. El cocultivo y la expansión de células T CD8 no activados se llevaron a cabo con células dendríticas (DC) maduras autólogas pulsadas con un epítopo restringido a A*01:01 derivado de MAGE-A1. La Figura 1B muestra un esquema de cocultivos teñidos con dextrámeros específicos para A*01:01 MAGE-A1 con código de barras de ADN y clasificados para aislar las células T CD8 específicos del antígeno. La secuenciación unicelular de células T CD8 positivos para dextrámeros se llevó a cabo con el uso de la plataforma 10X Genomics. La Figuras 1C muestra el análisis de la citotoxicidad de células T de 200 de los 1181 TCR $MAGEA1_{161-169}$ candidatos contra objetivos de NCIH1703 (HLA-A*01:01 + MAGEA1+) a E:T de 5:1. La Figura 1D muestra que 0 de 200 TCR fueron seleccionados del análisis para realizar una evaluación funcional adicional en función de las comparaciones con respecto a la citotoxicidad de los TCR comparadores (por ejemplo, Comparador 1 es el TCR T-Knife; Comparador 2 es el TCR Immatics; ver Tabla 4 para detalles de la secuencia). Se llevó a cabo un análisis adicional con un grupo de 1181 TCR específicos para MAGE-A1 con el uso de un ensayo ActivScan, que tuvo como resultado (59) TCR que fueron priorizados para el análisis funcional reiterado (ver Figuras 2A y 2B a continuación).

Las **Figuras 2A y 2B** muestran una representación esquemática de una estrategia ActivScan utilizada para identificar 14 TCR $MAGEA1_{161-169}$ con una alta expresión y afinidad y daos correspondientes. Las genotecas para TCR específicos de MAGE-A1 identificados por la plataforma ReceptorScan descrita en las Figuras 1A y 1B se sintetizaron con el uso de un método de clonación PISTACHIO propiedad de TScan (Figura 2A). La selección de TCR con alta expresión se llevó a cabo mediante la transducción de células T pan con virus que codifican genotecas de TCR clonados de PISTACHIO, seguido por aislamiento de células unidas a dextrámeros. La identificación de TCR con alta afinidad se llevó a cabo con el uso de ActivScan mediante la clasificación de células que responden a titulaciones de péptidos. Se priorizaron cincuenta y nueve (59) TCR para evaluaciones funcionales. Catorce (14) de 59 TCR mostraron citotoxicidad hacia una línea celular que expresa, de forma endógena, MAGE-A1, similar a un TCR comparador (es decir, el Comparador es el TCR Immatics; ver Tabla 4 para los detalles de la secuencia). La Figura 2B muestra los resultados de las células T pan se

transdujeron para expresar los 59 TCR específicos de MAGEA1 individualmente. Las células T modificados se cocultivaron con células objetivo etiquetadas con NucLight rojo de Incucyte®, tales como células NCIH1703. La supervivencia de las células objetivo se cuantificaron mediante imagenología dependiente del tiempo como una lectura de citotoxicidad de células T. Se muestra la supervivencia de 72 horas (criterio de valoración) para cada TCR (Figura 2B). Las células no transducidas (NTD) y dos TCR comparadores (por ejemplo, Comparador 1 es el TCR de T-Knife; Comparador 2 es el TCR de Immatics; ver Tabla 4 para los detalles de la secuencia) sirvieron como controles. Se seleccionaron catorce (14) de 59 TCR mostrados en la Figura 2B para evaluación adicional.

Las **Figuras 3A-3G** muestran resultados de evaluaciones funcionales de TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$. Las células T pan de PBMC aislados de PBMC de donantes saludables y transducidos para expresar TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ o los “TCR comparadores” (por ejemplo, Comparador 2 o Comparador es el TCR de Immatics y ver Tabla 4 para detalles de la secuencia; Comparador 3 es HN-32-41 (es decir, TCR 32-41 HM es Tabla 2A) de la publicación de patente estadounidense 2023/0270832, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia)y evaluados para determinar respuestas funcionales para dirigir células positivas y negativas para MAGEA1 y HLA-A*01:01. Las células T se evaluaron para determinar respuestas funcionales contra células objetivo. Se muestran los resultados para los mejores 14 (Figura 3 y Figura 3B), así como también los mejores 5 entre los mejores 14 (Figura 3C - Figura 3E) TCR candidatos. La Figura 3A y la Figura 3B muestran una respuesta funcional de 14 TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ a líneas celulares objetivo HLA-A*01:01$^+$ MAGEA1$^+$ NCIH1703 y A101D (Figura 3A), A375 (Figura 3B), y la línea celular de control negativas para HLA-A*01:01$^+$ MAGEA1 (Figura 3B). La Figura 3C muestra resultados de los ensayos para determinar la citotoxicidad de TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ a líneas celulares objetivo HLA-A*01:01$^+$ MAGE-A1$^+$ NCIH1703, A101D, y A375 (ver también Figura 3A y Figura 3B para los valores de TPM de cada línea celular) y a la línea de control negativas para MAGEA1 HLA-A*01:01$^+$ HEK293T (E:T 5:1). La Figura 3D muestra los resultados de células T pan aislados de PBMC de un segundo donante saludable (es decir, diferente del de la Figura 2A y la Figura 2B) fueron transducidos para expresar los mejores 5 TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ y evaluados para determinar las respuestas funcionales a las células objetivo positivas y negativas para MAGEA1 y HLA-A*01:01. Se

muestra la respuesta funcional de los 5 TCR específicos para MAGEA1$_{161-169}$ a las líneas celulares objetivo HLA-A*01:01^{+} MAGEA1^{+} NCIH1703, A101D y A375, y la línea celular de control negativa para HLA-A*01:01^{+} MAGEA1. Las células T modificados fueron cocultivados con líneas celulares objetivo etiquetadas con NucLight Rojo de Incucyte® en las relaciones E:T indicadas, y se cuantificó su supervivencia en un IncuCyte® como un lectura de citotoxicidad de las células T. La Figura 3E muestra resultados de los ensayos que miden a producción de IFN-γ en sobrenadantes de cocultivos a 24 h (E:T 1:1). La Figura 3F muestra que TCR 458 demuestra los resultados más potentes en los ensayos de titulación de péptidos. Las células T pan aislados de PBMC de un donante saludable se transdujeron para expresar, de forma individual, los mejores 5 TCR específicos para MAGEA1$_{161-169}$ y se evaluaron para determinar la secreción de citocina en respuesta a un cocultivo con células objetivo. Las células HEK293T de control negativas para HLA-A*01:01^{+} MAGEA1 se pulsaron con una serie de diluciones de 7 log del péptido MAGE-A1 EADPTGHSY. Las células T modificados se cocultivaron con linfocitos objetivo pulsados y lavados en una E:T de 1:1, y la secreción de citocinas en los sobrenadantes celulares se midieron 24 h luego del cocultivo. La Figura 3G muestra gráficas de puntos que representan la expresión de TCR, como se evaluó mediante la tinción de dextrámeros MAGE-A1$_{161-169}$ restringidos por A*01:01. El TCR comparador reconoce MAGE-A1 en un HLA diferente. Los resultados muestran una citotoxicidad potentes contra líneas cancerosas que expresan diversos niveles de MAGE-A1 and HLA-A*01:01 (ver, por ejemplo, las transcripciones por valores de millón de kilobases (TPM) para cada línea celular enumerada en la Figura 3A y Figura 3B).

La **Figura 4** muestra la eficacia *in vivo* de células T-TCR TSC-204-A0101.. Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo con el uso de materiales de grado de investigación de forma tal que la preparación y las características de las células T son iguales a las de los experimentos *in vitro* (y los vectores de expresión no expresan TGFBRII). Se implantaron ratones NCG inmunodeficientes de forma subcutánea con 2x10^{6} células NCI H1703 en el flanco derecho (n=7 ratones/grupo). El volumen tumoral se monitoreó a partir del día 7 al día 38 luego de la implantación. En el día 9 y 16, los ratones se inyectaron con 2x10^{7} células T-TCR TSC-204-A0101 o con células T de control donantes no transducidos (NTD). Se muestra el volumen tumoral promedio en el tiempo para los diferentes grupos.

Las **Figuras 5A y 5B** muestra la identificación de elementos fuera del objetivo para TCR

MAGE-A1-458 mediante un análisis SafetyScan de todo el genoma patentado. La Figura 5A muestra una representación esquemática de una estrategia de análisis SafetyScan. Los TCR fueron analizados con respecto a >500.000 fragmentos de proteínas que se extienden en cada proteína en la totalidad el proteoma humano para identificar las reactividades posibles, inclusive las reactividades con baja homología de secuencia con respecto al objetivo natural. La Figura 5B muestra los resultados de un análisis SafetyScan del TCR MAGE-A1-458, que identifica 9 proteínas diferentes a MAGEA1 que, cuando se sobreexpresa como fragmentos de 90 aminoácidos de largo, son reconocidos de forma putativa por el TCR en múltiples mosaicos.

Las **Figuras 6A y 6B** muestran que el TCR MAGE-A1-458 no muestra reactividad a elementos fuera del objetivo putativos, inclusive MAGE-A10 y MAGE-A11. La relevancia fisiológica de elementos fuera del objetivo potenciales puede evaluarse en detalle mediante el cocultivo de células T-TCR con células primarias que expresan naturalmente las proteínas de longitud completa a niveles normales. En un análisis representativo no taxativo, el TCR MAGE-A1-458 fue expuesto a péptidos fuera del objetivo potenciales o a la secuencia de proteínas de longitud completa de un no objetivo potencial, tal como contra péptidos MAGE-A10 o MAGE-A11 y/o secuencias de proteínas de longitud completa. La Figura 6A muestra que los péptidos indicados fueron pulsados en una serie de diluciones en células indicadoras A*01:01 HEK293T y la Figura 6B muestra los resultados de ORF de MAGEA10 expresado en las células A*01:01 HEK293T. Para la Figura 6A y la Figura 6B, el IFN-γ medido a partir de los sobrenadantes luego de 24 h de cocultivar con células T que expresan el TCR MAGE-A1-458.

La **Figura 7** muestra que MAGE-A1-458 no muestra la reactividad a células primarias humanas saludables. El TCR MAGE-A1-458 fue evaluado para determinar la reactividad a las células primarias derivadas de tejidos HLA-A*01:01+ saludables que expresan de forma natural elementos fuera del objetivo putativos identificados en SafetyScreen (ver Figura 5B anterior). Las células objetivo se pulsaron con el péptido MAGE-A1$_{161-169}$ (EADPTGHSY) o se dejaron sin pulsar y se cocultivaron con células T pan que expresan el TCR MAGE-A1-458 o no transducidos (NTD). El IFN-γ se midió en los sobrenadantes en el cocultivo luego de 24 h (E:T ~2:1). Se utilizaron células NCI-H1703 y A*01:01 HEK como controles positivos y negativos, respectivamente.

La **Figura 8** muestra que el TCR MAGE-A1-458 no muestra alorreactividad a ninguno de los

110 MHC.

Se cocultivaron células T que expresan el TCR MAGE-A1-458 o células T no transducidos con células HEK293T con MHC nulo modificadas para expresar los 110 MHC de Clase I más frecuentemente encontrados en la población estadounidense. La inhibición del crecimiento de células objetivo se midió como una lectura de alorreactividad.

La **Figura 9A-9B** muestra la función dependiente de la dosis de pMHC células T del TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso. Las células NCI-H1395 (transducidas con rojo Nuclight) se pulsaron con concentraciones indicadas del péptido MAGE-A1 y se cocultivaron con tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso (púrpura), células T de control UTF compatible con el donante con las concentraciones más altas del péptido (es decir, 20000 ng/mL) (azul) o cocultivados solos en ausencia del péptido o células T efectores (negro). Se cocultivaron células NCI-H1395 no pulsadas (0,0 ng/mL) con células T-TCR TSC-204-A0101 (gris) y células T de control UTF (rojo). La Figura 9A muestra los gráficos de la curva de crecimiento celular de NCI-H1395 relativo para cada concentración de péptidos durante 96 horas de cocultivo con células T efectores en una relación de 5:1 normalizado hasta t=0 h. Para cada donante, se llevó a cabo un cocultivo en triplicado (n=3). Las barras de error en cada punto de datos muestran el error estándar del promedio (SEM). La Figura 9B muestra el área bajo la curva (AUC) para determinar el crecimiento resultante de las células NCI-H1395 cocultivados con TSC-204-A0101 durante 96 horas como una función de la concentración de péptidos. Los datos se formalizaron hasta el crecimiento de las células en la condición no pulsada (0,0 ng/mL) (gris) y se expresaron como “supervivencia durante 96 h” de las células objetivo. Los datos se normalizaron donde el 0 % fue el valor más pequeño de cada conjunto de datos y el 100 % fue el valor más grande para cada conjunto de datos. Luego, se utilizó una curva de regresión no lineal (con el uso de la ecuación sigmoidea, 4PL, X es la concentración) para calcular la IC_{50} de inhibición del crecimiento celular de NCI-H1395.

Las **Figuras 10A-10H** muestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 segregan la granzima B y las citocinas proinflamatorias IFN-γ, IL-2, TNF-α en una forma dependiente del objetivo. Las células T-TCR TSC-204-A0101 (Figuras 10A-10D) o células T de control UTF compatibles con el donante (Figuras 10E-10H) de tres lotes (PD353, PD354 y PD355) se cultivó en la ausencia de las células objetivo (barras negras) o se cocultivaron en un E:T de 1:1 con cualquiera de la línea celular positiva para HLA-A*01:01, la línea celular objetivo negativa para

MAGE-A1 NCI-H1395 o tres líneas celulares diferentes positivas para HLA-A*01:01 positivas para MAGE-A1 (NCI-H1703; A375; A101D). Se recolectaron los sobrenadantes luego de ~24 horas de cocultivo y se evaluaron los niveles de citocinas proinflamatorias IFN-γ, IL-2 y TNF-α, así como también granzima B con un ensayo ELISA de 4 plex automatizado (ELLA de ProteinSimple). Los cocultivos se llevaron a cabo en triplicado y las barras de error representan errores estándar (SEM).

Las **Figuras 11A-11D** muestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 proliferaron en una forma dependiente del objetivo. Las células T-TCR TSC-204-A0101 se etiquetaron con tinte CTV y se cocultivaron (E:T 1:1) durante aproximadamente 4 días con las líneas celulares de cáncer indicadas. La Figura 11A muestra que la dilución CTV e evaluó dentro de la población total de células T (TCR^+CD34^+), células T citotóxicos ($TCR^+CD34^+CD8^+CD4^-$), y células T auxiliares ($TCR^+CD34^+CD8^+CD4^+$) Las células T cultivados en ausencia de objetivos ("solo células T") se utilizaron para establecer el pico de CTV de células T no divididos contra las células T divididos. Se muestran histogramas representativos a partir del lote PD355 de TSC-204-A0101 cocultivados con líneas celulares objetivo indicadas. Las Figuras 11B-11D son gráficas que muestran las cantidades de células T-TCR TSC-204-A0101 proliferantes (de división) de los lotes PD353, PD354 y PD355. Las gráficas de barras representan cantidades de células T de división totales (es decir, TCR^+CD34^+) (Figura 11B), células T auxiliares ($TCR^+CD34^+CD8^+CD4^+$) (Figura 11C) células T citotóxicos ($TCR^+CD34^+CD8^+CD4^-$) (Figura 11D). Los cocultivos se llevaron a cabo en triplicado y las barras para cada afección/donante muestran el error estándar de la media (SEM).

Las **Figuras 12A-12B** muestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 muestran citotoxicidad potente y selectiva. La Figura 12A muestra que tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso (curvas de crecimiento púrpura) y células T de control no transfectados (UTF) de donantes compatibles (curvas de crecimiento gris) se analizaron en el análisis de citotoxicidad a base de Incucyte para determinar su potencial citotóxico contra una línea celular de control positiva para HLA-A*01:01, negativa para MAGE-A1 (NCI-H1395) o tres líneas celulares objetivo positivas para HLA-A*01:01, positivas para MAGE-A1 (A375, NCI-H1703 y A101D). Las células T-TCR efectores y las células objetivo se cocultivaron a través de un intervalo de relaciones de células efectoras con respecto al objetivo (E:T que varía de 5:1 a 0,625:1) y el crecimiento de las células objetivo se midieron durante 96 horas.

Se muestran los datos representativos de las células T-TCR TSC-204-A0101 (panel izquierdo) y células T de control UTF (panel derecho) del lote PD355 durante 72 horas. Las células objetivo cultivadas solas sirven como controles negativos (curvas de crecimiento negras). Los cocultivos se llevaron a cabo en triplicados. El error estándar de la media (SEM) es más pequeño que los símbolos. La Figura 12B muestra la actividad citotóxica de los tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso durante 72 horas resumida como el área bajo la curva (AUC) de las curvas de crecimiento de las células objetivo cocultivadas con TSC-204-A0101 en una E:T de 2,5:1, normalizada con respecto a las curvas de crecimiento de las células objetivo cocultivadas con las células T de control UTF.

La **Figura 13** muestra el análisis con citometría de flujo fosfo de Phospho-SMAD2 o Total SMAD2 en células T-TCR TSC- 204-A0101 o células UTF. Se muestran datos obtenidos con células T-TCR representativos del proceso TSC- 204-A0101 (lotes PD353, PD354 y PD355) y células UTF similares al proceso a escala de laboratorio de los mismos donantes (PD353, PD354) y un tercer lote no relacionado (D6446) no tratado o tratado con TGFβ-1 10 ng/mL. Las células simples viables se caracterizan como positivas para CD34 (células T-TCR TSC-204-A0101) o negativas para CD34 (controles UTF) y estas subpoblaciones se caracterizan adicionalmente mediante análisis de histograma para phospho-SMAD2 o Total SMAD2. Las superposiciones del análisis de histograma consisten en phospho-SMAD2 o Total SMAD2 en células T-TCR positivos para CD34 no tratados (púrpura oscuro, relleno), células T-TCR positivos para CD34 tratados con TGFβ-1 (púrpura oscuro, abierto), UTF negativo para CD34 no tratado (negro, relleno) y UTF negativo para CD34 tratado con TGFβ-1 (negro, abierto).

La **Figuras 14** muestra el cronograma de inoculación, dosificación y análisis.

Las **Figuras 15A-15E** muestra la eficacia *in vivo* de TSC-204-A0101. Los ratones NCG se inocularon *s.c.* con células tumorales NCI-H1703. Una vez que el injerto tumoral fue exitoso (13 días luego de la inoculación), los animales se aleatorizaron en 7 grupos de tratamiento diferentes y se inyectaron con células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso (3 lotes evaluados, PD353, PD354, y PD355); o células T de control no transfectados (UTF) a partir de donantes compatibles, o un vehículo (PBS) en el día 1, y 8 del estudio (marcas triangulares). Se muestra el volumen tumoral medio de cada grupo de tratamiento de ratones (n=12) en el tiempo (Figura 15A). Se muestra el valor del área bajo la curva (AUC) que representa las curvas de crecimiento tumoral para ratones individuales para cada grupo de

tratamiento entre el día 0 y 40 (Figura 15B). Se muestra el volumen tumoral de ratones individuales en el tiempo (Figura 15C-15E). ***P=0,0008, *P=0,0421 en comparación con grupos de control UTF respectivos. Las barras de error representan SEM.

La **Figura 16** muestra el porcentaje de evolución del peso corporal en el tiempo a través de diferentes grupos. Los ratones NCG se incocularon *S.C.* con células tumorales NCI-H1703. Una vez que el injerto tumoral fue exitoso (6 días luego de la inoculación), los animales se aleatorizaron en 7 grupos de tratamiento diferentes y se inyectaron con células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso (3 lotes evaluados, PD353, PD354, y PD355); o células T de control no transfectados (UTF) a partir de donantes compatibles, o un vehículo (PBS) en el día 1, y 8 del estudio (marcas triangulares). Se muestra el cambio en el % de peso corporal para todos los grupos de tratamiento (n=12). Las barras de error representan SEM de la media.

La **Figura 17** muestra el perfil de alorreactividad de células T-TCR TSC-204-A0101 representativos desde el punto de vista mecánico. Las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos desde el punto de vista mecánico se cocultivaron con células HEK293T nulas para MHC que reexpresan uno de los 110 HLA clase I más frecuentemente encontrados en la población estadounidense durante el tiempo indicado. Un control positivo que consiste en células HEK293T que expresan un fragmento de MAGE-A1 que contiene el epítopo restringido a HLA-A*01:01 y se incluyeron HLA-A*01:01 (rojo) y un control negativo que consiste en células HEK293T nulas para MHC (azul) en el análisis. La inhibición del crecimiento celular objetivo por parte de las células T-TCR con respecto al de las células T de control UTD se midió durante 48 horas de cocultivo como una lectura de la reactividad de versiones representativas de forma mecánica del TCR terapéutico con respecto a las proteínas HLA alogénicas.

La **Figura 18** muestra un diagrama de flujo que describe las etapas y cronologías del ensayo de citocina para evaluar la reactividad fuera del tumor de células T-TCR TSC-204-A0101.

La **Figura 19** muestra la expresión de los no objetivo putativos del TCR terapéutico en células primarias. El ARN se extrajo de las células primarias y derivadas de iPSC y se secuenció. Los mapas térmicos muestran TPM (transcripciones por millón) calculado a partir de los conteos. La escala de color utilizó mapas térmicos de ARNseq tiene valores de TPM de cero configurados en blanco y valores sobre cero siguiendo una escala continua de color hasta 100

TPM. Los monocitos se etiquetaron como CD14 y las neuronas humanas se etiquetaron como neurona en el mapa térmico.

Las **Figuras 20A-20C** muestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 no muestran reactividad a células primarias HLA-A*01:01^{+}. Las células T-TCR TSC-204-A0101 y las células UTF compatibles con el donante se cocultivaron con un panel de células primarias y los sobrenadantes se evaluaron para determinar niveles de IFN-γ como una medición de reactividad de células T.

La **Figura 21** muestra la expresión de los elementos fuera del objetivo putativos del TCR terapéutico utilizado en células T-TCR TSC-204- A0101 en las líneas celulares de cáncer. El ARN se extrajo de los líneas celulares de cáncer y se secuenció. Los mapas térmicos muestran TPM (transcripciones por millón) calculado a partir de los conteos. La escala de color utilizó mapas térmicos de ARNseq tiene valores de TPM de cero configurados en blanco y valores sobre cero siguiendo una escala continua de color hasta 100 TPM.

Las **Figuras 22A-22C** muestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 no muestran reactividad a células cancerosas HLA-A*01:01^{+}. Las células T-TCR TSC-204-A0101 y las células UTF compatibles con el donante se cocultivaron con un panel de células cancerosas y los sobrenadantes se evaluaron para determinar niveles de IFN-γ como una medición de reactividad de células T.

Las **Figuras 23A-23C** muestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 no muestran reactividad a células HEK HLA- A*01:01^{+} que sobreexpresan CPO. Las células T-TCR TSC-204-A0101 y las células UTF compatibles con el donante se cocultivaron con un panel de clones de células simples HEK-A*01:01 que sobreexpresan CPO y los sobrenadantes se evaluaron para determinar niveles de IFN-γ como una medición de reactividad de células T.

La **Figura 24** muestra un mapa del vector pNVVD236 (es decir, pNVVD236_TSC-204-A01_TCR-458-MSCV-TCR-458-CDR-EF1α-dnTGFbRII-DHFR). CD: grupo de diferenciación, RNA-OUT: ARN antisentido contra levansucrasa bacteriana codificada por sacB, SV40: virus del simio 40, TCR: receptor de células T, ITR: repetición terminal invertida, QBend: anticuerpo CD34 antihumano de ratón, dnTGFbRII: receptor II de TGF beta negativo dominante, DHFR: marcador de selección de dihidrofolato reductasa.

Para cualquier figura que muestre un histograma de barras, una curva, u otros datos asociados con una referencia, las barras, la curva u otros datos presentados de izquierda a

derecha para cada indicación corresponden directamente y en orden a los cuadros de arriba a abajo o de izquierda a derecha, de la referencia a no ser que se indique otra cosa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de péptidos inmunogénicos de MAGEA1 (por ejemplo, los que comprenden o consisten en las secuencias que se mencionan en la Tabla 1), proteínas de unión (por ejemplo, las que tienen las secuencias que se mencionan en la Tabla 2) que reconocen el antígeno MAGEA1, y usos de los mismos. Se llevó a cabo una encuesta exhaustiva y sistemática para mapear los objetivos precisos de las células T reconocidos por un grupo inicial de células T de interés.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona, en parte, con los epítopos identificados (péptidos inmunodominantes) de la proteína MAGEA1 terapéuticamente relevante y composiciones relacionadas (por ejemplo, péptidos inmunodominantes, vacunas y otros similares), composiciones que comprenden péptidos inmunogénicos solos o con moléculas MHC, complejos MHC-péptido estables, métodos de diagnóstico, pronóstico y monitoreo de las respuestas inmunitarias a trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1 y métodos para prevenir y/o tratar trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1. La presente invención también se refiere, en parte, a proteínas de unión identificadas (por ejemplo, TCR), células huésped que expresan proteínas de unión (por ejemplo, TCR), composiciones que comprenden proteínas de unión (por ejemplo, TCR) y células huésped que expresan proteínas de unión (por ejemplo, TCR), métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear la respuesta de células T a células que expresan MAGEA1, y métodos para prevenir y/o tratar trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1.

I. Definiciones

Por conveniencia, aquí se recopilan ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones adjuntas.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A manera de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o más de un elemento. Además, las referencias a una tabla que se proveen en la presente abarcan a todas las sub-tablas de la tabla a no ser que se indique otra cosa.

El término "administrar" se refiere a proveer un agente farmacéutico o una composición a un

sujeto, e incluye, pero de manera no taxativa, a la administración por un profesional médico y a la autoadministración. Esto incluye la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, utilizando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de administración conocidos por los especialistas en la materia. En algunas formas de realización, las vías de administración para las proteínas de unión que se describen en la presente incluyen vías de administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", según se usa en la presente, se refiere a los modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluye, sin limitación: inyección e infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como electroporación *in vivo*. Como alternativa, una proteína de unión según se describe en la presente se puede administrar por vía no parenteral, por ejemplo, por una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

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

El término "coadyuvante", según se usa en la presente se refiere a sustancias, que cuando se administran antes, de manera conjunta o después de la administración de un antígeno aceleran, prolongan y/o mejoran la calidad y/o la fuerza de una respuesta inmunológica al antígeno en comparación con la administración del antígeno solo. Los coadyuvantes pueden aumentar la magnitud y la duración de la respuesta inmunológica inducida por la vacunación.

El término "anticuerpo", tal como se usa aquí, incluye a los anticuerpos completos y a cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "partes de unión al antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere, en una forma de realización, a una

glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión al antígeno de la misma. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (que aquí se abrevia como V_H) y una región constante de la cadena pesada. En ciertos anticuerpos de origen natural, la región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. En ciertos anticuerpos de origen natural, cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (que aquí se abrevia como V_L) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la cadena liviana está compuesta por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, que se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, que se denominan regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, ordenadas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y liviana contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo a diversas células inmunológicas (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico del complemento.

El término "célula presentadora de antígeno" o "APC" incluye a las células presentadoras de antígeno profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, y oligodendrocitos).

El término "parte de unión al antígeno" de una proteína de unión, por ejemplo, un TCR, como se usa en la presente, se refiere a una o más partes de un TCR que retienen la capacidad de unirse (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un antígeno (*por ejemplo,* un antígeno MAGEA1). Dichas partes tienen, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1500 aminoácidos de longitud, apropiadamente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 745 aminoácidos de longitud, apropiadamente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 300, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 200 aminoácidos, o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 o 100 aminoácidos de longitud. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un TCR se puede realizar

mediante fragmentos de un TCR de longitud completa. Algunos ejemplos de partes de unión abarcadas por el término "parte de unión al antígeno" de un TCR, incluyen (i) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_α y V_β de un TCR, (ii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (iii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un conector sintético. Además, aunque V_α y V_β, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite crearlas como una única cadena de proteína en la cual las regiones V_α y V_β están apareadas para formar moléculas monovalentes (conocidas como TCR monocatenario (scTCR)). Es la intención que también dichos TCR monocatenarios estén incluidos dentro del término "parte de unión al antígeno" de un TCR. Estos fragmentos de TCR se pueden obtener usando técnicas convencionales conocidas por los especialistas en la materia, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que las proteínas de unión completas. Las partes de unión al antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Los términos "región determinante de complementariedad" y "CDR" son sinónimos de "región hipervariable" o "HVR" y en el arte se sabe que se refieren a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de ciertas proteínas de unión, tales como regiones variables de TCR, que confieren especificidad de antígeno y/o afinidad de unión. En los TCR, en general hay tres CDR en cada región variable de la cadena α (αCDRl, αCDR2 y αCDR3) y tres CDR en cada región variable de la cadena β (βCDRl, βCDR2 y βCDR3). Se cree que la CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado. CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC.

El término “fluido corporal” se refiere a los fluidos que son excretados o secretados del cuerpo así como fluidos que habitualmente no son excretados o secretados del cuerpo (por ejemplo, fluido amniótico, humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, fluido cerebroespinal, cerumen y cera del oído, fluido de Cowper o fluido preeyaculatorio, quilo, quimo, heces, eyaculación femenina, fluido intersticial, fluido intracelular, linfa, menstruación, leche de mama, moco, fluido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, fluido sinovial, lágrimas, orina, lubricación vaginal, humor vítreo, vómitos). En algunas formas de realización, el fluido corporal comprende células inmunológicas, donde opcionalmente las células inmunológicas

son linfocitos citotóxicos tales como células T citotóxicas y/o células NK, células T CD4+, y semejantes.

El término “región codificante” se refiere a las regiones de una secuencia nucleotídica que comprende codones que son traducidos a residuos de aminoácido, mientras que el término “región no codificante” se refiere a las regiones de una secuencia nucleotídica que no son traducidas a aminoácidos (por ejemplo, regiones no traducidas 5' y 3').

El término “complementario” se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencia entre regiones de dos hebras de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma hebra del ácido nucleico. Se sabe que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico tiene la capacidad de formar enlaces de hidrógeno específicos (“apareamiento de bases”) con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela con la primera región si el residuo es timina o uracilo. De manera similar, se sabe que un residuo de citosina de una primera hebra de ácido nucleico tiene la capacidad de apareamiento de bases con un residuo de una segunda hebra de ácido nucleico que es antiparalela con la primera hebra si el residuo es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria con una segunda región del mismo ácido nucleico o uno diferente si, cuando las dos regiones están dispuestas de un modo antiparalelo, por lo menos un residuo nucleotídico de la primera región tiene la capacidad de apareamiento de bases con un residuo de la segunda región. En algunas formas de realización En algunas formas de realización, la primera región comprende una primera parte y la segunda región comprende una segunda parte, por lo que, cuando la primera y la segunda partes están dispuestas de manera antiparalela, por lo menos aproximadamente el 50% y, en otras formas de realización, por lo menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o cualquier rango intermedio, inclusive, tal como por lo menos aproximadamente el 80% -100%, de los residuos de nucleótidos de la primera parte tienen la capacidad de apareamiento de bases con residuos de nucleótidos en la segunda parte. En algunas formas de realización, todos los residuos de nucleótidos de la primera parte tienen la capacidad de apareamiento con los residuos de nucleótidos de la segunda parte.

Tal como se usa en la presente, el término “coestimula” con referencia a las células inmunológicas activadas incluye la capacidad de una molécula coestimulatoria para proveer

una segunda señal, mediada por receptor no activador (una “señal coestimulatoria”) que induce la proliferación o función efectora. Por ejemplo, una señal coestimulatoria puede resultar en una secreción de citoquinas, por ejemplo, en una célula T que ha recibido una señal mediada por receptor de células T. Las células inmunológicas que han recibido una señal mediada por un receptor celular, por ejemplo, mediante un receptor activador, se denominan “células inmunológicas activadas” en la presente.

"CD3" se conoce en el arte como un complejo de múltiples proteínas de seis cadenas (véase Abbas y Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (9ª Edición) (2018); Janeway y col. (Immunobiology) (9ª Edición) (2016)). En los mamíferos, el complejo comprende una cadena CD3γ, una cadena CD3δ, dos cadenas CD3ε y un homodímero de cadenas CD3ζ. Las cadenas CD3γ, CD3δ y CD3ε son proteínas de la superficie celular relacionadas, de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que contienen un solo dominio inmunoglobulina. Las regiones transmembrana de las cadenas CD3γ, CD3δ y CD3ε están cargadas negativamente, lo cual es una característica que se cree que permite que estas cadenas se asocien con regiones cargadas positivamente o residuos de cadenas receptoras de células T. Las colas intracelulares de las cadenas CD3γ, CD3δ y CD3ε contienen cada una un único motivo conservado conocido como motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o IT AM, mientras que cada cadena CD3ζ tiene tres ITAM. Sin deseos de ser limitados por una la teoría, se cree que los IT AM son importantes para la capacidad de señalización de un complejo TCR. El CD3 que se utiliza de acuerdo con la presente invención puede ser de diversas especies animales, que incluyen seres humanos, ratones, ratas u otros mamíferos.

Un "componente de un complejo TCR", como se usa en la presente, se refiere a una cadena TCR (es decir, TCRα, TCRβ, TCRγ o TCRδ), una cadena CD3 (es decir, CD3γ, CD3δ, CD3ε o CD3ζ), o una complejo formado por dos o más cadenas de TCR o cadenas de CD3 (por ejemplo, un complejo de TCRα y TCRβ, un complejo de TCRγ y TCRδ, un complejo de CD3ε y CD3δ, un complejo de CD3γ y CD3ε, o un complejo sub-TCR de TCRα, TCRβ, CD3γ, CD3δ, y dos cadenas CD3ε).

Un “receptor de células T comparador” se refiere a por lo menos un receptor de células T de referencia (por ejemplo, basado en Immatics o basado en T-Knife) que se ha informado en el estado del arte, tal como en la Patente de los EEUU N°: 10.874.731 (Immatics) y en Obenaus *et al.,* (2014) *Nat. Biotechnol.* 33: 402-407. En algunas formas de realización, el “Comparador

1” hace referencia a un TCR basado en el TCR T-Knife-T1367 de Obenaus *et al*. (2014) *Nat. Biotechnol.* 33:402-407, En algunas modalidades, el “Comparador 2”, también denominado simplemente como “Comparador”, es un TCR basado en el TCR R37P1C9 Immatics de la Patente de los EEUU N°: 10.874.731. Se usaron versiones modificadas de dichas secuencias parentales en los ejemplos y las secuencias de dichas versiones modificadas se muestran en la Tabla 4. En algunas formas de realización, el comparador del receptor de células T presenta las secuencias que se muestran en la Tabla 4. En algunas modalidades, el “Comparador 3” es HN-32-41 (es decir, TCR 32-41 HM en la Tabla 2A) de la publicación de patente estadounidense 2023/0270832, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia).

El término "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a una proteína de fusión que se modifica para que contenga dos o más secuencias de aminoácidos unidas entre sí de una manera que no ocurre naturalmente o no ocurre de manera natural en una célula huésped, donde dicha proteína de fusión puede funcionar como receptor cuando está presente en la superficie de una célula. Los CAR que abarca la presente invención incluyen una parte extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno (es decir, obtenido o derivado de una inmunoglobulina o molécula similar a inmunoglobulina, por ejemplo, un TCR específico para un antígeno MAGEA1, una proteína de unión derivada de TCR de cadena sencilla, un scFv derivado de un anticuerpo, un dominio de unión al antígeno derivado u obtenido de un inmunorreceptor asesino de una célula NK, y otros similares) unido a un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular (por ejemplo, un dominio efector, que opcionalmente contiene dominio(s) coestimulante(es)) (véase por ejemplo, Sadelain y col. (2013) Cancer Discov. 3: 388; véase también Harris y Kranz (2016) Trends Pharmacol. Sci. 37: 220; Stone y col. (2014)) Cancer Immunol. Immunother. 63: 1163).

Tal como se la usa en la presente, la expresión "respuesta de células T citotóxicos (CTL)" se refiere a una respuesta inmunológica inducida por células T citotóxicas. Las respuestas de las CTL están mediadas principalmente por células T $CD8^+$.

El término "que consiste esencialmente en" no es equivalente a "que comprende" y se refiere a los materiales o pasos que se especifican en un reivindicación, o a aquellos que no afectan materialmente las características básicas de un objeto que se reivindica. Por ejemplo, un dominio, región o módulo de proteína (por ejemplo, un dominio de unión, región bisagra,

módulo conector) o una proteína (que puede tener uno o más dominios, regiones o módulos) "consiste esencialmente en" una secuencia de aminoácidos en particular cuando la secuencia de aminoácido un dominio, región, módulo o proteína incluye extensiones, supresiones, mutaciones o una combinación de las mismas (por ejemplo, aminoácidos en el extremo amino o carboxi o entre dominios) que, en combinación, contribuyen como máximo en un 20% (por ejemplo, como máximo en un 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%) de la longitud de un dominio, región, módulo o proteína y no afectan sustancialmente (es decir, no reducen la actividad en más del 50%, por ejemplo, en no más del 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1%) la actividad de los uno o más dominios, regiones, módulos o proteínas (por ejemplo, la afinidad de unión a la diana de una proteína de unión).

La expresión “determinar un régimen de tratamiento adecuado para el sujeto” se considera que se refiere a la determinación de un régimen de tratamiento (es decir, una terapia individual o una combinación de diferentes terapias que se usan para la prevención y/o el tratamiento de la infección viral en el sujeto) para un sujeto que se comienza, modifica y/o termina en base o esencialmente en base o por lo menos parcialmente en base a los resultados del análisis de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo es comenzar una terapia con adyuvante después de la cirugía cuyo propósito es disminuir el riesgo de recurrencia, otro podría ser modificar la dosificación de una quimioterapia particular. La determinación se puede basar, además de los resultados de acuerdo al análisis de acuerdo con la presente invención, en las características personales del sujeto a tratar. En la mayoría de los casos, la determinación actual del régimen de tratamiento adecuado para el sujeto se realizará en base al médico o doctor que lo atiende.

El término “receptor de TGFβ dominante negativo” o “DN-TGFβR” se refiere a una variante o mutante del receptor beta del factor de crecimiento transformante (TGF) que provee resistencia a la señalización de TGFβ. Hay cinco receptores tipo II (receptores de activación) y siete receptores tipo I (receptores de propagación de la señalización). El receptor de TGFβ activo es un heterotetrámero que consiste en dos receptores de TGF β I (TGFβRI) y dos receptores de TGF β II (TGFβRII). En algunas formas de realización, el DN-TGFβR es un DN-TGFβRII (es decir, una variante o mutante del receptor de TGF beta II). En algunas formas de realización, la resistencia es al efecto supresor de la señalización de TGFβ es una célula inmunológica, tal como una célula T, donde dicho TGFβ puede ser producido por células

cancerosas o por otras células inmunológicas dentro de un entorno celular, tal como por células del estroma, macrófagos, células mieloides, células epiteliales, células asesinas naturales y semejantes. Los inhibidores de la señalización de TGFβ son bien conocidos en el arte e incluyen, en un sentido no taxativo, un TGFβ mutante que secuestra receptores y de esa manera inhiben la señalización, los anticuerpos que se unen a TGFβ y/o receptores de TGFβ (por ejemplo, lerdelimumab, metlimumab, fressolimumab y semejantes), proteínas de unión a TGFβ solubles tales como porciones de receptores de TGFβ que secuestran TGFβ (por ejemplo, proteínas de fusión TGFβRII-Fc) u otros agentes de unión, tales como beta-glicanos. Cualquiera y todos los inhibidores de la señalización de TGFβ conocidos se pueden usar en lugar de, o además de, DN-TGFβR (por ejemplo, DN-TGFβRII) que se describen en la presente. En algunas formas de realización, un DN-TGFβR carece de una porción intracelular necesaria para una señalización mediada por TGFβ, tal como el dominio intracelular completo, un dominio de señalización de quinasa, etc. Las construcciones de DN-TGFβR son bien conocidas en el arte (véase las formas de realización representativas, no limitantes, en Brand *y col.,* (1993) *J. Biol., Chem., 268:* 11500-11503; Weiser *y col.,* (1993) *Mol. Cell Biol.,* 13: 7239-7247; Bollard *y col.,* (2002) *Blood* 99: 3179-3187; publ. PCT WO 2009/152610; publ. PCT WO 2017/156484; Kloss *y col.,* (2018) *Mol. Ther.,* 26: 1855-1866; publ. PCT WO 2019/089884; publ. PCT WO 2020/042647; y publ. PCT WO 2020/042648.

Tal como se usa en la presente, una "célula progenitora hematopoyética" es una célula que puede derivarse de células madre hematopoyéticas o tejido fetal y es capaz de diferenciarse adicionalmente en tipos de células maduras (por ejemplo, células del sistema inmunológico). Las células progenitoras hematopoyéticas ejemplares incluyen a aquellas con un fenotipo $CD24^{Lo}$ Lin- $CD117^{+}$ o los que se encuentran en el timo (que se denominan timocitos progenitores).

“Homóloga” como se usa en la presente, se refiere a la similitud de secuencia nucleotídica entre dos regiones de la misma hebra de ácido nucleico o entre regiones de dos hebras diferentes de ácido nucleico. Cuando una posición de residuo nucleotídico en ambas regiones está ocupada por el mismo residuo nucleotídico, entonces las regiones son homólogas en esa posición. Una primera región es homóloga a una segunda región si por lo menos una posición de residuo nucleotídico de cada región está ocupada por el mismo residuo. La homología entre dos regiones se expresa en términos de la relación de las posiciones de residuo

nucleotídico de las dos regiones que están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico. A modo de ejemplo, una región que tiene la secuencia nucleotídica 5'-ATTGCC-3' y una región que tiene la secuencia nucleotídica 5'-TATGGC-3' comparte el 50% de homología. En algunas formas de realización, la primera región comprende una primera parte y la segunda región comprende una segunda parte, por lo que, por lo menos aproximadamente el 50%, y, en otras formas de realización, por lo menos aproximadamente el 75%, 76%, 77%, 78%, 79 %, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80% -100%, de las posiciones de los residuos de nucleótidos de cada una de las partes están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico. En algunas formas de realización, todas las posiciones de residuos nucleótidos de cada una de las partes están ocupadas por el mismo residuo nucleotídico.

El término "trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno MAGEA1" puede ser cualquier trastorno hiperproliferativo donde el antígeno MAGEA1 está presente en un complejo de MHC (por ejemplo, HLA) expresado por al menos algunas células en hiperproliferación en el sujeto. Los ejemplos de trastorno hiperproliferativos caracterizados por complejos MAGEA1:HLA incluyen formas malignas sólidas, tales como las que se describirán con detalle *infra*.

El término “respuesta inmunológica” incluye respuestas inmunológicas mediadas por células T y/o células B. Las respuestas inmunológicas ejemplificativas incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citoquinas y citotoxicidad celular. Además, el término respuesta inmunológica incluye respuestas inmunológicas que están afectadas indirectamente por la activación de células T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y activación de células de respuestas por citoquinas, por ejemplo, macrófagos.

Una capacidad aumentada de estimular una respuesta inmunológica o el sistema inmunológico puede ser el resultado de una actividad agonista mejorada de los receptores coestimulantes de células T y/o una actividad antagonista mejorada de los receptores inhibidores. Una mayor capacidad de estimular una respuesta inmunológica o el sistema inmunológico puede reflejarse en ocasiones en un aumento de la EC_{50} o el nivel máximo de actividad en un ensayo que mide una respuesta inmunológica, por ejemplo, un ensayo que mide los cambios en la liberación de citoquinas o quimioquinas, la actividad citolítica

(determinada directamente en las células diana o indirectamente mediante la detección de CD107a o granzimas) y la proliferación. La capacidad de estimular una respuesta inmunológica o la actividad del sistema inmunológico puede ser mejorada en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 500% o más.

El término "agente inmunoterapéutico" puede incluir a cualquier molécula, péptido, anticuerpo u otro agente que pueda estimular el sistema inmunológico del huésped para generar una respuesta inmunológica a una célula cancerosa en el sujeto. Hay diversos agentes inmunoterapéuticos que son útiles en las composiciones y métodos que se describen en la presente.

El término "célula inmunológica" se refiere a cualquier célula del sistema inmunológico que se origina a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea, que da lugar a dos linajes principales: una célula progenitora mieloide (que da lugar a células mieloides como monocitos, macrófagos, células dendríticas, megacariocitos y granulocitos); y una célula progenitora linfoide (que da lugar a células linfoides como las células T, las células B y las células asesinas naturales (NK)). Algunos ejemplos de células del sistema inmunológico incluyen una célula T $CD4^+$, una célula T $CD8^+$, una célula T CD4 CD8 doble negativa, una célula T gd, una célula T reguladora, una célula asesina natural y una célula dendrítica. Los macrófagos y las células dendríticas se pueden denominar "células presentadoras de antígeno" o "APC", que son células especializadas que pueden activar las células T cuando un receptor del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de la APC en complejo con un péptido interactúa con un TCR en la superficie de una célula T.

Una “proteína aislada” se refiere a una proteína que está sustancialmente libre de otras proteínas, material celular, medio de separación, y medio de cultivo cuando se aísla de células o se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan de manera química. Una proteína “aislada” o “purificada” o parte biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido del cual deriva la proteína de unión, el anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de un polipéptido biomarcador o fragmento del

mismo, en donde la proteína está separada de los componentes celulares de la célula de la cual se aísla o se produce de manera recombinante. En una forma de realización, la expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de una proteína biomarcadora o fragmento de la misma, que tiene menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de proteína no biomarcadora (que en la presente se denomina una “proteína contaminante”) o, en algunas formas de realización, menos de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o menos, o cualquier rango entre los mismos inclusive, por ejemplo, por ejemplo, menos de entre aproximadamente 1% y 5%, de proteína no biomarcadora. Cuando la proteína de unión, el anticuerpo, polipéptido, péptido o proteína de fusión o fragmento de la misma, por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de la misma, se produce de manera recombinante, puede estar sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o menos, o cualquier rango entre dichos valores inclusive, por ejemplo, menos de entre aproximadamente 1% y 5%, del volumen del preparado de proteína.

Tal como se usa en la presente, el término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM, IgG1, IgG2C y otros similares) que está codificada por genes de región constante de la cadena pesada.

Tal como se usa en la presente, es la intención que el término "K_D" se refiera a la constante de equilibrio de disociación de una interacción proteína de unión-antígeno particular. La afinidad de unión de las proteínas de unión abarcadas por la presente invención se puede medir o determina mediante ensayos de unión de la proteína de unión a una diana estándar, por ejemplo, ensayos de competencia, ensayos de saturación o inmunoensayos estándar, tales como ELISA o RIA. Un valor de Kd relativamente más bajo indica una afinidad de unión relativamente más alta (por ejemplo, valores de Kd menores o iguales a aproximadamente $5x10^{-4}$ M (500 uM) incluyen un valor de Kd de $1x10^{-4}$ M (100 uM) y una Kd de 100 uM indica una afinidad de unión relativamente mayor en comparación con una Kd de 500 uM).

Un “kit” es cualquier producto (por ejemplo, un envase o recipiente) que comprende por lo menos un reactivo, por ejemplo, una sonda o molécula pequeña, para detectar y/o afectar de manera específica la expresión de un marcador abarcado por la presente invención. El kit puede ser promocionado, distribuido, o vendido como una unidad para realizar los métodos abarcados por la presente invención. El kit puede comprender uno o más reactivos necesarios

para expresar una composición útil en los métodos abarcados por la presente invención. En determinadas formas de realización, el kit además puede comprender un estándar de referencia, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica para una proteína que no afecta o regula vías de señalización que controlan el crecimiento, división, migración, supervivencia o apoptosis de la célula. Un especialista en el arte puede imaginar muchas de dichas proteínas de control, que incluyen, a título enunciativo no taxativo, marcas moleculares comunes (por ejemplo, proteína fluorescente verde y beta-galactosidasa), proteínas no clasificadas en ninguna de las vías de que abarcan el crecimiento, división, migración, supervivencia o apoptosis celular por referencias de GeneOntology, o proteínas estándares interno ubicuas. Los reactivos en el kit pueden ser provistos en recipientes individuales o como mezclas de dos o más reactivos en un recipiente individual. Además, se pueden incluir materiales didácticos que describen el uso de las composiciones en el kit.

Tal como se usa en la presente, el término "ligado" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. La unión puede ser covalente o no covalente. La unión también puede ser genético (es decir, fusionado de manera recombinante). Dichas uniones se pueden lograr usando una amplia variedad de técnicas reconocidas en el arte, tales como la conjugación química y la producción de proteínas recombinantes.

En algunas formas de realización, un "conector", puede hacer referencia a una secuencia de aminoácidos que conecta dos proteínas, polipéptidos, péptidos, dominios, regiones o motivos y puede proveer una función de espaciador compatible con la interacción de los dos subdominios de unión de modo que el polipéptido que se obtiene como resultado retenga una afinidad de unión específica (por ejemplo, scTCR) a una molécula diana o retenga la actividad de señalización (por ejemplo, complejo TCR). En algunas formas de realización, un conector está compuesto por entre aproximadamente dos y aproximadamente 35 aminoácidos, por ejemplo, o entre aproximadamente cuatro y aproximadamente 20 aminoácidos o entre aproximadamente ocho y aproximadamente 15 aminoácidos o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 aminoácidos.

El término “MAGEA1” se refiere a un miembro particular de la familia de genes de antígenos de melanoma agrupados en el cromosoma humano Xq28 (por ejemplo, el chromosome X: 153,179,284-153,183,880, hebra directa; GRCh38:CM000685,2) que también se conoce como el antígeno de cáncer/testículos 1.1 (CT1.1); el antígeno asociado a melanoma 1; MAGE1;

familia A de antígenos de melanomas, 1 (dirige la expresión del antígeno MZ2-E); familia 1 de antígenos de cáncer/testículos, miembro 1; antígeno asociado a melanoma MZ2-E; familia A1 de antígenos de melanomas; antígeno de cáncer/testículos 1.1; antígeno de melanoma MAGE-1; antígeno MAGE-1; antígeno Z2-E, MGC9326; y MAGE1A (Mao *y col.,* (2019) *J. Hematol. Oncol.,* 12: 106; Fanipakdel *y col.,* (2019) *J. Cell Physiol.,* 234: 12080-12086; Gu *y col.,* (2018) *Thorac. Cancer* 9: 431-438; Mecklenburg *y col.,* (2017) *Clin. Cancer Res.,* 23: 1213-1219; Wang *y col.,* (2016) *Biochem. Biophys. Res., Commun.,* 473: 959-965; Kozakova *y col.,* (2015) *Cell Cycle* 14: 920-930; Cannuyer *y col.,* (2013) *PLoS One* 8: e5874; Pereira *y col.,* (2012) *Oncol., Rep.,* 27: 1843-1848; Ogata *y col.,* (2011) *Ann. Surg. Oncol.,* 18: 1195-1203; Roch *y col.,* (2010) *Anticancer Res.,* 30: 1617-1623; Dango *y col.,* (2010) *Lung Cancer* 67: 290-295; van der Bruggen *y col.,* (1991) *Science* 254: 1643-1647). MAGEA1 es un antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T citolíticos y se cree que está involucrado en la regulación de la transcripción por medio de interacción con SNW1 y reclutamiento de la histona desacteliasa HDAC1, así como en la inhibición de la transactivación del dominio intracelular notch (NICD), desarrollo embrionario, asociación con algunos trastornos hereditarios (por ejemplo, disqueratosis congénita) y/o transformación de tumores o aspectos del progreso de tumores (por ejemplo, carcinomas gástricos, carcinomas hepatocelulares, etc.). MAGEA1 no presenta una expresión elevada en tejidos normales, excepto por los testículos, y se expresa en tumores de varios tipos histológicos, tales como melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma de mama invasivo y carcinoma urotelial de vejiga.

El término "MAGEA1" se utiliza con la intención de incluir fragmentos, variantes (por ejemplo, variantes alélicas) y derivados de los mismos. Las secuencias representativas de ADNc del MAGEA1 humano y de la proteína MAGEA1 humana son bien conocidas en el arte y están disponibles para el público en el Nacional Center for Biotechnology Información (NCBI) (véase, por ejemplo, ncbi.nlm.nih.gov/gene/4100). Por ejemplo, el MAGEA1 humano (NP_004979,3) puede ser codificado por el transcripto (NM_004988,5). Las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de ortólogos de MAGEA1 en organismos distintos de humanos son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, MAGEA1 de chimpancé (XM_529226,2 y XP_529226,2) y MAGEA1 de ratón (Cromosoma X: 155088686-155089793; ensamblaje de

Mus musculus versión 104,39 (GRCm39)). Las secuencias representativas de MAGEA1 también se muestran más adelante en la Tabla 3.

Los anticuerpos anti-MAGEA1 adecuados para detectar la proteína MAGEA1 son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, los anticuerpos AM32863PU, AM50138PU, AP06212PU, AP13128PU- TA312178, TA39275, TA339275, TA339276 y TA347677 (OriGene, Rockville, MD); los anticuerpos orb167376 y orb11016 (Biorbyt, Cambridge, Reino Unido); los anticuerpos A03570 y AO3570-1 (Boster Bio, Pleasanton, CA); los anticuerpos E22-11B2-E9 y N1C3 (GeneTex, Irvince, CA); los anticuerpos AFLGC-MAGEA1, MA5-37821 y MA1-91067 (Invitrogen, Waltham, MA); los anticuerpos ABIN2782493 y ABIN2782494 (Anticuerpos-online, Limerick, PA); y los anticuerpos MA454 y 6C1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Además, hay reactivos bien conocidos para detectar la expresión de MAGEA1. Adicionalmente, en las listas de productos comerciales de una variedad de compañías se pueden encontrar muchas construcciones de ARNip, ARNhc, CRISPR para modular la expresión de MAGEA1, tales como los clones de marco de lectura abierto (ORF) MG212171, MR212171, MR212171L3, MR212171L3V, MR212171L4, MR212171L4V, RC202134, RC202134L3, RC202134L3V, RC202134L4, RC202134L4V, y RG202134 (OriGene, Rockville, MD), los noqueos con CRISPR GA102785, GA202555, KN202134, KN202134BN, KN202134LP, KN202134RB, KN402134 y KN509652 (OriGene, Rockville, MD) y los clones de ARN de interferencia (ARNi), tal como clones de ARNip y ARNhc, incluidos SR302776, TL311617, SR410578, TL311617V, TTL516288, TL516288V, TL704467, TL04467V, TR311617, TR516288, y TR704467 (OriGene, Rockville, MD). Cabe señalar que el término se puede utilizar también para hacer referencia a cualquier combinación de características que se describen en la presente con respecto a las moléculas MAGEA1. Por ejemplo, para describir una molécula de MAGEA1 abarcada por la presente invención se puede utilizar cualquier combinación de: composición de secuencia, identificación porcentual, longitud de secuencia, estructura de dominio, actividad funcional, etc.

El término "antígeno MAGEA1" o "antígeno peptídico MAGEA1" o "antígeno peptídico que contiene MAGEA1" o "epítopo MAGEA1" o "epítopo peptídico MAGEA1" o "péptido MAGEA1" se refiere a una porción inmunogénica de MAGEA1 producida de manera natural o por síntesis. En algunas formas de realización, la longitud de la proteína del antígeno MAGEA1 puede variar desde aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24, 25 aminoácidos, o cualquier rango intermedio, inclusive, por ejemplo, puede ser de 8-15 aminoácidos. En algunas formas de realización, la proteína antigénica MAGEA1 puede formar un complejo con una molécula del MHC (por ejemplo, HLA) de tal manera que una proteína de unión de la presente divulgación que reconoce un complejo péptido MAGEA1:MHC (por ejemplo, HLA) se puede unir (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a dicho complejo. En la Tabla 1 se muestran las secuencias representativas del antígeno peptídico MAGEA1.

El término "complejo mayor de histocompatibilidad" (MHC) se refiere a las glicoproteínas que suministran antígenos peptídicos a la superficie celular. Las moléculas de MHC de clase I son heterodímeros que tienen una membrana que abarca una cadena (con tres dominios a) y una microglobulina b2 asociada no covalentemente. Las moléculas de MHC de clase II están compuestas por dos glicoproteínas transmembrana, a y b, las cuales atraviesan la membrana. Cada cadena tiene dos dominios. Las moléculas de MHC de clase I transportan a la superficie celular péptidos que se originan en el citosol, donde las células T $CD8^+$ reconocen un complejo de antígeno peptídico-MHC (pMHC). Las moléculas de MHC de clase II suministran péptidos que se originan en el sistema vesicular a la superficie celular, donde son reconocidos por las células T $CD4^+$. El MHC humano se conoce como antígeno leucocitario humano (HLA).

Los términos “prevenir”, “previniendo”, “prevención”, “tratamiento profiláctico”, y similares se refieren a la reducción de la probabilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno, o condición en un sujeto, que no tiene, pero que tiene riesgo de o que es susceptible a desarrollar una enfermedad, trastorno, o condición.

El término “pronóstico” incluye una predicción del curso y resultado probable de un cáncer o la posibilidad de recuperación de la enfermedad. En algunas formas de realización, el uso de algoritmos estadísticos provee un pronóstico de un cáncer en un individuo. Por ejemplo, el pronóstico puede ser cirugía, desarrollo de un subtipo clínico del cáncer, desarrollo de uno o más factores clínicos, o recuperación de la enfermedad.

Tal como se usa en la presente, "porcentaje de identidad" entre secuencias de aminoácidos es sinónimo de "porcentaje de homología", que se puede determinar usando el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-2268, modificado por Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877. El algoritmo indicado está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215:

403-410. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST se realizan con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un polinucleótido según se describe en la presente. Las búsquedas de proteínas por BLAST se realizan con el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a un polipéptido de referencia. Para obtener alineamientos con faltas de coincidencia para fines comparativos, se utiliza Gapped BLAST, tal como se describe en Altschul et. al., (*Nucleic Acids Res,* 25: 3389-3402 (1997). Cuando se emplean los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente o material encapsulante de solvente líquido o sólido, relacionado con el transporte o acarreo del compuesto sujeto desde un órgano o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo.

El término "relación" se refiere a una relación entre dos números (por ejemplo, puntajes, sumas, y semejantes). Aunque las relaciones se pueden expresar en un orden particular (por ejemplo, de *a* a *b* o a:b), un especialista en el arte reconocerá que la relación subyacente entre los números se puede expresar en cualquier orden sin perder el significado de la relación subyacente, aunque la observación y la correlación de tendencias basadas en la relación pueden invertirse.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") se refiere a una célula que comprende un ácido nucleico que no está presente de manera natural en la célula, por ejemplo, una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que en la presente invención la referencia a las células no solo es a la célula objeto particular, sino que también abarca la progenie de dicha célula. Debido a que en generaciones sucesivas pueden producirse ciertas modificaciones debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula madre, pero todavía está incluida dentro del alcance del término célula de acuerdo con la presente invención.

El término "respuesta del cáncer", "respuesta a la inmunoterapia" o "respuesta a los moduladores de la terapia de combinación de citotoxicidad/inmunoterapia mediada por células T" se refiere a cualquier respuesta del trastorno hiperproliferativo (por ejemplo, cáncer) a un

agente para tratar el cáncer, por ejemplo, un modulador de la citotoxicidad mediada por células T y una inmunoterapia, preferiblemente para un cambio en la masa y/o volumen tumoral después del inicio de la terapia neoadyuvante o adyuvante. El término "terapia neoadyuvante" se refiere a un tratamiento administrado antes del tratamiento primario. Los ejemplos de terapia neoadyuvante pueden incluir quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal. La respuesta del trastorno hiperproliferativo se puede evaluar, por ejemplo, para determinar su eficacia o en una situación neoadyuvante o coadyuvante, donde se puede comparar el tamaño de un tumor después de la intervención sistémica con el tamaño y las dimensiones iniciales medidas por CT, PET, mamografía, ultrasonido o palpación. Las respuestas también se pueden evaluar mediante la medición del calibre o el examen patológico del tumor después de una biopsia o resección quirúrgica. La respuesta se puede registrar de manera cuantitativa como cambio porcentual en el volumen del tumor o de manera cualitativa como "respuesta patológica completa" (pCR), "remisión clínica completa" (cCR), "remisión clínica parcial" (cPR), "clínica estable enfermedad ”(cSD),“ enfermedad clínica progresiva ”(cPD) u otros criterios cualitativos. La evaluación de la respuesta del trastorno hiperproliferativo se puede realizar poco después del inicio de la terapia neoadyuvante o coadyuvante, por ejemplo, después de unas pocas horas, días, semanas o preferiblemente después de unos pocos meses. Un criterio de valoración típico para la evaluación de la respuesta es luego de la finalización de la quimioterapia neoadyuvante o luego de la eliminación quirúrgica de las células tumorales residuales y/o el lecho tumoral. Por lo general, esto ocurre tres meses después del inicio de la terapia neoadyuvante. En algunas formas de realización, la eficacia clínica de los tratamientos terapéuticos que se describen en la presente se puede determinar midiendo el índice de beneficio clínico (CBR, las siglas en inglés de *Clinical Benefit Rate*). El índice de beneficio clínico se mide determinando la suma del porcentaje de pacientes que están en remisión completa (RC), el número de pacientes que están en remisión parcial (RP) y el número de pacientes que tienen enfermedad estable (SD) a la vez en un punto de tiempo de por lo menos 6 meses desde el final de la terapia. La abreviatura de esta fórmula es CBR = CR + PR + SD durante 6 meses. En algunas formas de realización, el CBR para un régimen terapéutico particular contra el cáncer es por lo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o más. Los criterios adicionales para evaluar la respuesta a las terapias contra el cáncer están relacionados con la

"supervivencia", que incluye a todo lo siguiente: supervivencia hasta la mortalidad, que también se conoce como supervivencia global (donde dicha mortalidad puede ser independiente de la causa o relacionada con el tumor); "Supervivencia libre de recurrencia" (donde el término recurrencia incluirá a la recurrencia tanto localizada como a distancia); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (donde el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas con el mismo). La duración de dicha supervivencia se puede calcular con referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, el momento del diagnóstico o el comienzo del tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para que incluyan la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un período de tiempo determinado y la probabilidad de recurrencia del tumor. Por ejemplo, para determinar los valores umbral apropiados, se puede administrar un régimen terapéutico contra el cáncer en particular a una población de sujetos y el resultado se puede correlacionar con las mediciones de biomarcadores que se determinaron antes de la administración de cualquier terapia contra el cáncer. La medida del resultado puede ser la respuesta de la patología a la terapia administrada en el entorno neoadyuvante. Como alternativa, las medidas de resultado, tales como la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad, se pueden controlar durante un período de tiempo para los sujetos que siguen la terapia del cáncer para los que se conocen valores de medición de biomarcadores. En ciertas formas de realización, las dosis administradas son dosis estándar conocidas en el arte para agentes terapéuticos contra el cáncer. El período de tiempo durante el cual los sujetos son monitoreados puede variar. Por ejemplo, los sujetos se pueden controlar durante por lo menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 meses. Los valores de umbral de medición de biomarcadores que se correlacionan con el resultado de una terapia contra el cáncer se pueden determinar usando métodos bien conocidos en el arte, tales como los que se describen en la sección de Ejemplos.

Como se indicó, los términos también pueden referirse a un pronóstico mejorado, por ejemplo, reflejado en un mayor tiempo hasta la recidiva, que es el período hasta la primera recidiva suprimiendo el segundo cáncer primario como un primer evento o muerte sin evidencia de recidiva, o un aumento de la supervivencia general, que es el período desde el tratamiento hasta la muerte por cualquier causa. Responder, o presentar una respuesta, significa que se

alcanza un punto final beneficioso cuando se expone a un estímulo. Como alternativa, un síntoma negativo o perjudicial se minimiza, mitiga o atenúa con la exposición a un estímulo. Se apreciará que la evaluación de la probabilidad de que un tumor o sujeto muestre una respuesta favorable es equivalente a evaluar la probabilidad de que el tumor o sujeto no muestre una respuesta favorable (es decir, que exhiba una falta de respuesta o que no responda).

El término "resistencia" se refiere a una resistencia adquirida o natural de una muestra de cáncer o de un mamífero a una terapia contra el cáncer (es decir, que no responde o tiene una respuesta reducida o limitada al tratamiento terapéutico), por ejemplo, presentando una respuesta a un tratamiento terapéutico reducida en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más, por ejemplo, de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive. La reducción en la respuesta se puede medir por comparación con la misma muestra de cáncer o mamífero antes de adquirir la resistencia, o por comparación con una muestra de cáncer diferente o un mamífero que se sabe que no presenta resistencia al tratamiento terapéutico. Una resistencia típica adquirida a la quimioterapia se denomina "resistencia a múltiples fármacos". La resistencia a múltiples fármacos puede ser mediada por la glicoproteína P o puede ser mediada por otros mecanismos, o puede ocurrir cuando un mamífero está infectado con un microorganismo resistente a múltiples fármacos o una combinación de microorganismos. La determinación de la resistencia a un tratamiento terapéutico es rutinaria en el arte y dentro de la habilidad de un médico con una experiencia normal, por ejemplo, se puede medir mediante ensayos de proliferación celular y ensayos de muerte celular según se describe en la presente como "sensibilización". En algunas formas de realización, la expresión "invierte la resistencia" se refiere a que el uso de un segundo agente en combinación con una terapia primaria contra el cáncer (por ejemplo, quimioterapia o radioterapia) puede producir una disminución significativa en el volumen del tumor con un nivel de significación estadística (por ejemplo, $p < 0,05$) cuando se compara con el volumen tumoral de un tumor sin tratar en el caso de que la terapia del cáncer primario (por ejemplo, quimioterapia o radioterapia) sola no pueda producir una disminución estadísticamente significativa en el volumen tumoral en comparación con el volumen tumoral del tumor sin tratar. Esto generalmente es válido para las mediciones del

volumen del tumor realizadas en un momento en que el tumor sin tratar está creciendo logarítmicamente.

El término “muestra” usado para detectar o determinar la presencia, ausencia, o el nivel de por lo menos un biomarcador típicamente es tejido cerebral, fluido cerebroespinal, sangre entera, plasma, suero, saliva, orina, deposiciones (por ejemplo, heces), lágrimas, y cualquier otro fluido del cuerpo (por ejemplo, como se describe precedentemente en la definición de “fluidos corporales”), o una muestra de tejido (por ejemplo, biopsia) tales como piel, muestra de colon, o tejido de resección quirúrgica. En algunas formas de realización, los métodos que abarca la presente invención comprenden además obtener la muestra del individuo antes de detectar o determinar la ausencia, presencia o el nivel de por lo menos un marcador en la muestra.

El término "sensibilizar" se refiere a alterar las células cancerosas o las células tumorales de una manera que permita un tratamiento más eficaz del cáncer asociado con una terapia contra el cáncer (por ejemplo, punto de control antiinmunitario, quimioterapia y/o radioterapia). En algunas formas de realización, las células normales no se ven afectadas en un grado que haga que las terapias dañen indebidamente a las células normales. Una sensibilidad aumentada o una sensibilidad reducida a un tratamiento terapéutico se mide de acuerdo con un método conocido en el arte para el tratamiento en particular y los métodos que se describen a continuación en la presente, que incluyen, pero de manera no taxativa, ensayos de proliferación celular (Tanigawa y col. (1982) Cancer Res. 42: 2159-2164) y ensayos de muerte celular (Weisenthal y col. (1984) Cancer Res. 94: 161-173; Weisenthal y col. (1985) Cancer Treat Rep. 69: 615-632; Weisenthal y col., En: Kaspers GJL, Pieters R, Twentyman PR, Weisenthal LM, Veerman AJP, eds. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Langhorne, PA: Harwood Academic Publishers, 1993: 415-432; Weisenthal (1994) Contrib. Gynecol. Obstet 19: 82-90). La sensibilidad o resistencia también se puede medir en animales midiendo la reducción del tamaño del tumor durante un período de tiempo, por ejemplo, 6 meses para humanos y 4-6 semanas para ratones. Una composición o un método sensibiliza la respuesta a un tratamiento terapéutico si el aumento de la sensibilidad del tratamiento o la reducción de la resistencia es del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más, por ejemplo, de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, en comparación con la sensibilidad o resistencia al tratamiento en ausencia

de dicha composición o método. La determinación de la sensibilidad o resistencia a un tratamiento terapéutico es rutinaria en el arte y está dentro de la habilidad de un médico con una experiencia normal. Debe entenderse que cualquier método según se describe en la presente para mejorar la eficacia de una terapia contra el cáncer se puede aplicar por igual a métodos para sensibilizar células hiperproliferativas o cancerosas (por ejemplo, células resistentes) a la terapia contra el cáncer.

El término "molécula pequeña" es un término de la técnica e incluye a las moléculas que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1000 o un peso molecular menor de aproximadamente 500. En una forma de realización, las moléculas pequeñas no comprenden exclusivamente enlaces peptídicos. En otra forma de realización, las moléculas pequeñas no son oligoméricas. Los ejemplos de compuestos de moléculas pequeñas que se pueden seleccionar para determinar su actividad incluyen, pero de manera no taxativa, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, carbohidratos, moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, policétidos) (Cane y col. (1998) *Science* 282: 63-68) y bibliotecas de extractos de productos naturales. En otra forma de realización, los compuestos son compuestos orgánicos no peptídicos pequeños. En una forma de realización adicional, una molécula pequeña no es biosintética.

El término "unión específica" se refiere a la unión de proteínas que se unen a un antígeno predeterminado. Normalmente, la proteína de unión se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menor o igual que aproximadamente $5x10^{-4}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-4}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-5}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-5}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-6}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-6}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-7}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-7}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-8}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-8}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-9}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-9}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-10}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-10}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-11}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-11}$ M, menor o igual que aproximadamente $5x10^{-12}$ M, menor o igual que aproximadamente $1x10^{-12}$ M, o aún menor, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, por ejemplo, entre aproximadamente 1-50 micromolar, 1-100 micromolar, 0,1-500 micromolar, y valores similares, cuando se determina mediante un ensayo de unión, tal como

la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento de ensayo BIAcore™ usando un antígeno de interés como analito y la proteína de unión como ligando. En algunas formas de realización, la proteína de unión se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es por lo menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, o 10,0 veces o mayor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las frases "una proteína de unión que reconoce un antígeno" y "una proteína de unión específica para un antígeno" se usan de manera indistinta en la presente con el término "una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno." "Unión selectiva" es un término relativo que se refiere a la capacidad de una proteína de unión para discriminar la unión de un antígeno frente a otro, tal como un miembro de la familia o un antígeno diana en particular frente a un miembro de la familia relacionado o un antígeno diana. Por ejemplo, los datos analíticos provistos en la sección de Ejemplos demuestran que las proteínas de unión que se describen en la presente se unen específicamente a epítopos inmunogénicos de MAGEA1 y/o se unen selectivamente a diversos epítopos relacionados (por ejemplo, epítopos inmunogénicos de MAGEA1 y secuencias estrechamente relacionadas) discriminando tales dianas de la gran mayoría de otros posibles epítopos disponibles en el genoma humano.

El término “sujeto” se refiere a cualquier animal, mamífero o humano sano, o cualquier animal, mamífero o human que padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, tal como un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1. El término "sujeto" es sinónimo de "paciente.”

El término "supervivencia" incluye a todo lo siguiente: supervivencia hasta la mortalidad, que también se conoce como supervivencia global (donde dicha mortalidad puede ser independientemente de la causa o relacionada con el tumor); "supervivencia libre de recurrencia" (donde el término recurrencia incluirá recurrencia tanto localizada como a distancia); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (donde el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas con el mismo). La duración de dicha supervivencia se puede calcular con referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, el momento del diagnóstico o el comienzo del tratamiento) y punto final (por ejemplo,

muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para que incluyan la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un período de tiempo determinado y la probabilidad de recurrencia del tumor.

El término “efecto sinérgico” se refiere al efecto combinado de dos o más agentes (por ejemplo, un agente relacionado con MAGEA1 que se describe en la presente y otra terapia, tal como un TCR dirigido a MAGEA1 adicional, una terapia anticáncer, inmunoterapia, etc. para tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1) que es mayor que la suma de los efectos separados de los agentes/terapias contra el cáncer solos.

Tal como se usa en la presente, el término "respuesta mediada por células T" se refiere a una respuesta mediada por células T, incluyendo a las células T efectoras (por ejemplo, células $CD8^+$) y células T auxiliares (por ejemplo, células $CD4^+$). Las respuestas mediadas por células T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de células T.

Un “polinucleótido transcripto” o “transcripto nucleotídico” es un polinucleótido (por ejemplo, un ARNm, ARNnh, un ADNc, o un análogo de dicho ARN o ADNc) que es complementario a un homólogo con todo el ARNm maduro o una porción del mismo hecho por transcripción de un ácido nucleico biomarcador y procesamiento postranscripcional normal (por ejemplo, corte y empalme), si lo hay, del transcripto de ARN, y transcripción reversa del transcripto del ARN.

Una "célula T" es una célula del sistema inmunológico que madura en el timo y produce receptores de células T (TCR). Las células T pueden ser naïve (no expuestas al antígeno; mayor expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127 y CD45RA, y disminución de la expresión de CD45RO en comparación con T_{CM}), células T de memoria (T_M) (con experiencia de antígenos y de larga vida) y células efectoras (con experiencia de antígenos, citotóxicas). Las T_M se pueden dividir en subconjuntos de células T de memoria central (T_{CM}, mayor expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y CD95, y disminución de la expresión de CD54RA en comparación con las células T naïve) y células T de memoria efectoras (T_{EM}, expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, CD45RA y expresión aumentada de CD127 en comparación con las células T naïve o T_{CM}). Las células T efectoras (T_E) se refieren a células T CD8+ citotóxicas con experiencia en antígenos que tienen una expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28 y son positivos para granzima y perforina en comparación con las T_{CM}. Otros ejemplos de células T incluyen células T regulatorias, tales como las células T

regulatorias $CD4^+$ $CD25^+$ ($Foxp3^+$) y células Tregl7, así como células Trl, Th3, $CD8^+$ CD28 y células T con actividad Qa-1 restringida.

Las células T convencionales, que también se conocen como Tconv o Teffs, tienen funciones efectoras (por ejemplo, secreción de citoquinas, actividad citotóxica, anti-autorreconocimiento y otras similares) para aumentar las respuestas inmunológicas en virtud de la expresión en las mismas de uno o más receptores de células T. Las Tcons o Teffs generalmente se definen como cualquier población de células T que no es una Treg e incluyen, por ejemplo, células T naïve, células T activadas, células T de memoria, Tcons en reposo o Tcons que se han diferenciado hacia, por ejemplo, los linajes Th1 o Th2. En algunas formas de realización, los Teffs son un subconjunto de células T no Treg. En algunas formas de realización, las Teff son Teff $CD4^+$ o Teff CD8+, tales como células T auxiliares CD4+ (por ejemplo, Th0, Th1, Tfh o Th17) y células T citotóxicas CD8+. Como se describe adicionalmente en la presente, las células T citotóxicas son células T CD8+. Las “Tcons naïve” son células T $CD4^+$ que se han diferenciado en la médula ósea y se han sometido con éxito a procesos positivos y negativos de selección central en el timo, pero que aún no han sido activadas por exposición a un antígeno. Las Tcons naïve se caracterizan comúnmente por la expresión en superficie de L-selectina (CD62L), ausencia de marcadores de activación como CD25, CD44 o CD69, y ausencia de marcadores de memoria como CD45RO. Por lo tanto, se cree que las Tcons naïve son inactivas y no se dividen, requiriendo interleuquina-7 (IL-7) e interleuquina-15 (IL-15) para la supervivencia homeostática (véase por lo menos, WO 2010/101870). La presencia y actividad de dichas células no son deseables en el contexto de la supresión de respuestas inmunológicas. A diferencia de las Treg, las Tcon no son anérgicas y pueden proliferar en respuesta a la activación del receptor de células T basado en antígenos (Lechler y col. (2001) Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 356: 625-637).

Las células "T efectoras" ("T_{eff}" o "T_E") se refieren a las células T (por ejemplo, Células T CD4+ y CD8+) con actividades citolíticas, así como a las células T auxiliares (Th), que secretan citoquinas y activan y dirigen a otras células inmunológicas, pero no incluye a las células T regulatorias (células Treg).

Un "receptor de células T" o "TCR" se refiere a un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (que tiene un dominio de unión variable, un dominio constante, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta; véase, por ejemplo, Janeway y col. (1997)

Curr. Biol Publ. 4: 33) que es capaz de unirse (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un péptido antigénico unido a un receptor MHC Un TCR se puede encontrar en la superficie de una célula o en forma soluble y generalmente está compuesto por un heterodímero que tiene cadenas alfa y beta (que también se conocen como TCRα y TCRβ, respectivamente), o cadenas γ y δ (que también se conocen como TCRγ y TCRδ, respectivamente). Al igual que las inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), la parte extracelular de las cadenas de TCR (por ejemplo, cadena α y cadena β) contienen dos dominios de inmunoglobulina: un dominio variable (por ejemplo, dominio variable de la cadena α o V_α y un dominio variable de la cadena β o V_β; típicamente los aminoácidos 1 a 116 en base a la numeración de Kabat (Kabat y col. (1991) "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 5ª ed.) en el extremo N-terminal, y un dominio constante (por ejemplo, un dominio constante de cadena α o C_α, típicamente los aminoácidos 117 a 259 basado en Kabat, un dominio constante de cadena β o C_β, típicamente los aminoácidos 117 a 295 basado en Kabat) en el Extremo C-terminal y adyacente a la membrana celular. También, al igual que las inmunoglobulinas, los dominios variables contienen regiones determinantes de complementariedad ("CDR", que también se denominan regiones hipervariables o "HVR") separadas por regiones de marco ("FR") (véase, por ejemplo, Fores y col. (1990) Proc. Natl. Acad Sci. USA. 87: 9138; Chothia y col. (1988) EMBO J. 7: 3745; Lefranc y col. (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55). En algunas formas de realización, un TCR se encuentra en la superficie de una célula T (o linfocito T) y se asocia con el complejo CD3. La fuente de un TCR abarcado por la presente invención puede pertenecer a diversas especies animales, por ejemplo, puede ser un ser humano, ratón, rata, conejo u otro mamífero.

Debe entenderse que el término "receptor de células T" o "TCR" abarca a los TCR completos, así como a las partes de unión al antígeno o sus fragmentos de unión al antígeno. En algunas formas de realización, el TCR es un TCR intacto o de longitud completa, que incluye los TCR en la forma αβ o la forma γδ. En algunas formas de realización, el TCR es una parte de unión al antígeno que es menor que un TCR de longitud completa pero que se une a un péptido específico unido en una molécula de MHC, por ejemplo, que se une a un complejo de MHC-péptido. En algunos casos, una parte de unión al antígeno o un fragmento de un TCR puede contener solo una parte de los dominios estructurales de un TCR de longitud completa o

intacto, pero aún es capaz de unirse al epítopo peptídico, como el complejo MHC-péptido, al cual se une el TCR completo. En algunos casos, una parte de unión al antígeno contiene los dominios variables de un TCR, tales como la cadena variable α y la cadena variable β de un TCR, que es suficiente para formar un sitio de unión para unirse a un complejo péptido-MHC específico. Generalmente, las cadenas variables de un TCR contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) relacionadas con el reconocimiento del péptido, MHC y/o complejo MHC-péptido.

Nomenclatura establecida por el Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT) (véase también Scaviner y Lefranc (2000) Exp. Clin. Immunogenet. 17: 83-96 y 97-106; Folch y Lefranc (2000) Exp. Clin. Immunogenet, 17: 107-114; T Cell Receptor Factsbook ", (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8). El IMGT provee secuencias únicas que se utilizan para describir un TCR, y las secuencias que se describen en la presente se pueden identificar por referencia a dichas secuencias únicas que se proveen en la presente. Las secuencias de TCR están disponibles públicamente en la base de datos IMGT en imgt.org.

Tal como se describió anteriormente, los TCR heterodiméricos alfa/beta nativos tienen una cadena alfa y una cadena beta. En términos generales, cada cadena comprende regiones variables, de unión y constantes, y la cadena beta también suele contener una pequeña región de diversidad entre las regiones variable y de unión, pero esta región de diversidad frecuentemente se considera parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de complementariedad) hipervariables incluidas en una secuencia de marco. Se sabe que CDR3 es el principal mediador del reconocimiento de antígenos. Hay diversos tipos de regiones variables de la cadena alfa (Vα) y diversos tipos de regiones variables de la cadena beta (Vβ) que se distinguen por su marco, secuencias CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 definida parcialmente. En la nomenclatura IMGT, los tipos de Vα se denominan mediante un número TRAV único. Por ejemplo, "TRAV4" define a una región Vα de TCR que tiene un marco único y secuencias CDR1 y CDR2, y una secuencia CDR3 que está definida parcialmente por una secuencia de aminoácidos que se conserva de un TCR a otro pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de TCR a TCR. De manera similar, "TRBV2" define una región Vβ de TCR que tiene un marco y secuencias CDR1 y CDR2 únicos, pero con una secuencia CDR3 sólo definida parcialmente.

Se sabe que dentro de los loci alfa y beta, existen respectivamente 54 genes variables alfa, de los cuales 44 son funcionales, y 67 genes variables beta, de los cuales 42 son funcionales.

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

Los conjuntos de genes que codifican las cadenas alfa y beta del TCR se encuentran en diferentes cromosomas y contienen segmentos de genes V, (D), J y C separados, que se unen por reordenamiento durante el desarrollo de las células T. Esto conduce a una diversidad muy alta de las cadenas alfa y beta de las células T debido al gran número de posibles eventos de recombinación que ocurren entre los 54 genes variables alfa de TCR y los 61 genes alfa J o entre los 67 genes variables beta, dos genes beta D y 13 genes beta J. El proceso de recombinación no es preciso e introduce una mayor diversidad dentro de la región CDR3. Cada gen de las regiones variables alfa y beta también puede comprender variantes alélicas, designadas en la nomenclatura IMGT como TRAVxx*01 y*02, o TRBVx-x*01 y*02 respectivamente, aumentando así aún más la magnitud de la variación. Del mismo modo, algunas de las secuencias TRBJ tienen dos variaciones conocidas. (Téngase en cuenta que la ausencia de un calificador "*" se refiere a que solo se conoce un alelo para la secuencia relevante). Se ha estimado que el repertorio natural de TCR humanos que se obtuvieron como resultado de la recombinación y la selección tímica comprende aproximadamente 10^6 secuencias de cadena beta únicas, determinadas a partir de la diversidad de CDR3 (Arstila y col. (1999) *Science* 286: 958-961) y podría ser incluso superior (Robins y col. (2009) *Blood* 114: 4099-4107). Se estima que cada cadena beta se aparea con por lo menos 25 cadenas alfa diferentes, generando así una mayor diversidad (Arstila y col. (1999) Science 286: 958-961).

Por lo tanto, el término "dominio variable alfa de TCR" se refiere a la concatenación de las regiones TRAV y TRAJ; a una región TRAV solamente; o a una región TRAV y una región TRAJ parcial, y el término dominio constante alfa de TCR se refiere a la región TRAC extracelular, o a una secuencia TRAC truncada o de longitud completa C-terminal. De manera similar, el término "dominio variable beta de TCR" se refiere a la concatenación de las

regiones TRBV y TRBD/TRBJ; solo a las regiones TRBV y TRBD; solo a las regiones TRBV y TRBJ; o a las regiones TRBV y TRBD parcial y/o TRBJ, y el término dominio constante beta de TCR se refiere a la región TRBC extracelular, o a una secuencia TRBC truncada o de longitud completa C-terminal. Esta nomenclatura de dominio variable alfa de TCR y dominio variable de TCR beta se aplica de manera similar a los dominios variables de las cadenas delta de TCR gamma y TCR, respectivamente, para los TCR gamma/delta. Un especialista en el arte puede obtener secuencias de genes TRAV, TRAJ, TRAC, TRBV, TRBJ y TRBC, por ejemplo, mediante la base de datos IMGT disponible públicamente.

El término "complejo TCR" se refiere a un complejo formado por la asociación de CD3 con TCR. Por ejemplo, un complejo TCR puede estar compuesto por una cadena CD3γ, una cadena CD3δ, dos cadenas CD3ε, un homodímero de cadenas CD3ζ, una cadena TCRα y una cadena TCRβ. Como alternativa, un complejo TCR puede estar compuesto por una cadena CD3γ, una cadena CD3δ, dos cadenas CD3ε, un homodímero de cadenas CD3ζ, una cadena TCRγ y una cadena TCRδ.

El término "efecto terapéutico" se refiere a un efecto local o sistémico en animales, en particular en mamíferos, y más particularmente en seres humanos causados por una sustancia farmacológicamente activa. El término significa entonces cualquier sustancia destinada al uso en el diagnóstico, la cura, alivio, tratamiento o prevención de la enfermedad o para mejorar el desarrollo y las condiciones físicas o mentales deseables en un animal o ser humano.

Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a la cantidad de una sustancia que produce algún efecto que se desea, por ejemplo, un efecto terapéutico local o sistémico deseado, en por lo menos una subpoblación de células de un animal con una razonable relación beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento. En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia dependerá del índice terapéutico, la solubilidad, la farmacocinética, la vida media y semejantes. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos objeto se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD_{50} y la DE_{50}. En algunas formas de realización, se usan composiciones que exhiben grandes índices terapéuticos. En algunas formas de realización, la LD_{50} (dosis letal) se puede medir y puede estar reducido, por ejemplo, en por lo menos 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más para el agente con relación a la falta de administración del agente. De manera similar, se puede medir la DE_{50} (es decir, la concentración que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) y puede ser, por ejemplo, mayor en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más para el agente con relación a la falta de administración del agente. Además, de manera similar, se puede medir la IC_{50} y puede ser, por ejemplo, mayor en por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más para el agente con relación a la falta de administración del agente. En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica de las células T en un ensayo se puede incrementar en por lo menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aún en un 100%. En otra forma de realización, se puede lograr una disminución de por lo menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aún un 100% de la carga viral.

El término "tratar" se refiere al manejo terapéutico o la mejora de una condición (por ejemplo, una enfermedad o trastorno) de interés. El tratamiento puede incluir, pero de manera no taxativa, a la administración de un agente o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) a un sujeto. El tratamiento se realiza típicamente en un esfuerzo por alterar el curso de una enfermedad (término que se usa para indicar cualquier enfermedad, trastorno, síndrome o condición no deseable que justifique o justifique potencialmente la terapia) de una manera beneficiosa para el sujeto. El efecto del tratamiento puede incluir revertir, aliviar, reducir la gravedad, retrasar el inicio, curar, inhibir el progreso y/o reducir la probabilidad de aparición o recurrencia de la enfermedad o uno o más síntomas o manifestaciones de la enfermedad. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero en un sentido no taxativo, prevenir la aparición o la recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de toda consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución del índice de progreso de la enfermedad, alivio o paliación del estado de enfermedad y remisión o mejora de la prognosis. El agente terapéutico se le puede administrar a un sujeto que tiene una enfermedad o que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad con relación a un miembro de la población general. En algunas formas de

realización, el agente terapéutico se le puede administrar a un sujeto que ha padecido una enfermedad pero que ya no muestra evidencia de la misma. El agente se puede administrar, por ejemplo, para reducir la probabilidad de recurrencia de una enfermedad evidente. El agente terapéutico se puede administrar de manera profiláctica, es decir, antes del desarrollo de cualquier síntoma o manifestación de una enfermedad. "Tratamiento profiláctico" se refiere a proveer tratamiento médico y/o quirúrgico a un sujeto que no ha desarrollado una enfermedad o no muestra evidencia de una enfermedad, por ejemplo, para reducir la probabilidad de que ocurra la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad en caso de que ocurra. Es posible que se haya detectado que el sujeto se encuentra riesgo de desarrollar la enfermedad (por ejemplo, presenta un mayor riesgo con relación a la población general) o que presenta un factor de riesgo que aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad.

El término "falta de respuesta" incluye la refractividad de las células cancerosas a la terapia o la refractividad a la estimulación de las células Terapéuticas, por ejemplo, las células inmunológicas, por ejemplo, a la estimulación mediante un receptor activador o una citoquina. La falta de respuesta se puede producir, por ejemplo, debido a la exposición a inmunosupresores o a la exposición a altas dosis de antígeno. Tal como se usa en la presente, los términos "anergia" o "tolerancia" incluyen la refractividad para la activación de la estimulación mediada por receptor. Dicha refractividad es generalmente específica del antígeno y persiste después de que ha cesado la exposición al antígeno que genera tolerancia. Por ejemplo, la anergia en las células T (en oposición a la falta de respuesta) se caracteriza por la falta de producción de citoquinas, por ejemplo, IL-2. La anergia de las células T ocurre cuando las células T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (una señal mediada por un receptor de células T o CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimulante) En estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (incluso si la reexposición se produce en presencia de un polipéptido coestimulante) da como resultado una falta de producción de citoquinas y, por lo tanto, un fracaso de la proliferación. Sin embargo, las células T anérgicas pueden proliferar si se cultivan con citoquinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de las células T también se puede observar por la falta de producción de IL-2 por los células T medida por ELISA o por un ensayo de proliferación usando una línea celular indicadora. Como alternativa, se puede usar una construcción de gen informante. Por ejemplo, las células T anérgicas no pueden iniciar la

transcripción del gen IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador 5' del gen IL-2 o por un multímero de la secuencia AP1 que puede encontrarse dentro del potenciador (Kang y col. (1992) *Science* 257: 1134).

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

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una proteína de unión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (por ejemplo, una cadena de TCRα o una cadena β (o una cadena γ y una cadena δ para TCR γδ)) que participa en la unión de la proteína de unión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (por ejemplo, TCR) al antígeno. Los dominios variables de la cadena α y la cadena β (V_α y V_β, respectivamente) de un TCR nativo generalmente tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones de marco conservadas (FR) y tres CDR. El dominio V_α está codificado por dos segmentos de ADN separados, el segmento de gen variable y el segmento de gen de unión (V-J); el dominio V_β está codificado por tres segmentos de ADN separados, el segmento de genes variables, el segmento de genes de diversidad y el segmento de genes de unión (V-D-J). Un solo dominio V_α o V_β puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, los TCR que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar usando un dominio V_α o V_β de un TCR que se une al antígeno para seleccionar una biblioteca de dominios V_α o V_β complementarios, respectivamente.

El término “vector” hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. En algunas formas de realización, un vector es un episoma, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosómica. En algunas formas de realización, los vectores son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente se denominan en la presente "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión que son útiles en las técnicas de ADN recombinante frecuentemente se encuentran en forma de "plásmidos" que se refieren generalmente a bucles circulares de ADN de doble hebra, que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan de manera indistinta ya que el plásmido es la forma de vector que se utiliza más comúnmente.

Sin embargo, como apreciarán los especialistas en el arte, es la intención que la presente invención incluya otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y más adelante serán conocidas en el arte.

Existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias nucleotídicas que pueden codificar para la proteína, según lo definido por el código genético (mostrado a continuación). De manera similar, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia nucleotídica de un ácido nucleico particular y la secuencia de aminoácidos codificada por ese ácido nucleico, según lo definido por el código genético.

CÓDIGO GENÉTICO

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

Una característica importante y bien conocida del código genético es su redundancia, por la cual, para la mayoría de los aminoácidos usados para construir proteínas, se puede emplear más de un triplete de nucleótidos codificante (ilustrado precedentemente). Por lo tanto, un número de diferentes secuencias nucleotídicas pueden codificar para una dada secuencia de aminoácidos. Dichas secuencias nucleotídicas son consideradas funcionalmente equivalentes ya que resultan en la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (a pesar de que ciertos organismos pueden traducir algunas secuencias de manera más eficaz que otros). Además, ocasionalmente, se puede encontrar una variante metilada de una purina o pirimidina en una dada secuencia nucleotídica. Dichas metilaciones no afectan a la relación codificante entre el codón trinucleotídico y el correspondiente aminoácido.

En vista de lo anterior, se puede usar una secuencia nucleotídica de un ADN o ARN que codifica para un ácido nucleico biomarcador (o cualquier parte del mismo) para derivar la secuencia de aminoácidos del polipéptido, usando el código genético para traducir el ADN o ARN a una secuencia de aminoácidos. De manera similar, para la secuencia de aminoácidos del polipéptido, se pueden deducir secuencias nucleotídicas correspondientes que pueden codificar para el polipéptido a partir del código genético (el cual, debido a su redundancia, producirá múltiples secuencias de ácido nucleico para cualquier secuencia de aminoácidos dada). Por lo tanto, la descripción y/o divulgación en la presente de una secuencia nucleotídica que codifica para un polipéptido se debe considerar que también incluye la descripción y/o divulgación de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica. De manera similar, descripción y/o divulgación de una secuencia de aminoácidos del polipéptido en la presente se debe considerar que también incluye la descripción y/o divulgación de todas las posibles secuencias nucleotídicas que pueden codificar la secuencia de aminoácidos.

II. Péptidos

En determinados aspectos, en la presente se proveen métodos y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de trastornos asociados con la expresión de MAGEA1 por medio de la inducción de una respuesta inmunológica contra MAGEA1 o contra células que expresan MAGEA1 con relación a la administración de los péptidos inmunogénicos MAGEA1, ácidos

nucleicos que codifican los mismos y/o células que expresan los mismos, como se describe en la presente.

En determinadas formas de realización, el péptido inmunogénico MAGEA1 comprende (por ejemplo, consiste en) un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A. Los epítopos peptídicos descritos en la presente se pueden combinar con moléculas de MHC, tales como moléculas HLA particulares que tienen alelos de la cadena alfa de HLA particulares. Por ejemplo, los péptidos de la Tabla 1A se identificaron en asociación con un MHC cuya cadena alfa era del serotipo HLA-A*01, tal como el codificado por un alelo HLA-A*01:01, como se describe adicionalmente en la sección de Ejemplos. En algunas formas de realización, los péptidos inmunogénicos MAGEA1 se pueden combinar con una molécula de MHC, en donde la molécula de MHC comprende una cadena alfa de MHC que es de un serotipo de HLA de HLA-A*01, opcoinalmente donde el alelo HLA es HLA-A*01:01.. En algunas formas de realización, los péptidos inmunogénicos MAGEA1 derivan de una proteína MAGEA1 humana y/o de una proteína MAGEA1 que se muestra en la Tabla 3. En algunas formas de realización, se administra uno o más péptidos inmunogénicos MAGEA1 solos o en combinación con un adyuvante.

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

Tabla 1: Epítopos de MAGEA1

Tabla 1A

Epítopos MAGEA1 presentados por el serotipo HLA-A*01 de HLA

Epítopos peptídicos
EADPTGHSY

* La Tabla 1, tal como la Tabla 1A, incluye epítopos peptídicos, así como moléculas de polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más identidad en su longitud completa con una secuencia de aminoácidos de cualquiera las secuencias que se enumeran en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A, o una porción de las mismas. Dichos polipéptidos pueden tener la función del polipéptido o péptido de longitud completa, como se describirá adicionalmente en la presente.

En algunas formas de realización, en la presente se proveen polipéptidos MAGEA1 y/o ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos MAGEA1. En algunas formas de realización, los polipéptidos MAGEA1 son polipéptidos que incluyen una secuencia de aminoácidos de longitud suficiente como para generar una respuesta inmunológica específica de MAGEA1. En determinadas formas de realización, el polipéptido MAGEA1 también incluye aminoácidos que no corresponden a la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de MAGEA1 y una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína o polipéptido distinto de MAGEA1). En algunas formas de realización, el polipéptido MAGEA1 solo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína MAGEA1 o un fragmento de la misma.

En algunas formas de realización, el polipéptido MAGEA1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste esencialmente en o consiste en por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 373 o más, o cualquier rango entre estos valores inclusive (por ejemplo, 7-25, 8-22, 9-22, etc.) de aminoácidos consecutivos de una secuencia de aminoácidos de la proteína MAGEA1, tal como las que se muestran en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A. En algunas modalidades, los aminoácidos consecutivos son idénticos a la secuencia de aminoácido de MAGEA1 establecida en la Tabla 3. En algunas modalidades, los polipéptidos MAGEA1 comprenden, consisten esencialmente en o consiste en uno o más epítopos de péptidos seleccionados del grupo que consiste en epítopos de péptido MAGEA1 enumerado en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A.

Como es bien sabido por los especialistas en el arte, los polipéptidos que tienen similitudes de secuencia sustanciales pueden causar una reacción inmunológica idéntica o muy similar en un animal huésped. Por lo tanto, en algunas formas de realización, un derivado, equivalente, variante, fragmento o mutante de un péptido inmunogénico MAGEA1 descrito en la presente, o un fragmento de los mismos, también puede ser adecuado en los métodos y las composiciones que se proveen en la presente.

En algunas formas de realización, en la presente se proveen variaciones o derivados de los polipéptidos inmunogénicos MAGEA1. El polipéptido alterado puede tener una secuencia de aminoácidos alterada, por ejemplo, mediante una sustitución conservadora, y aún generar respuestas inmunológicas que reaccionan con el antígeno proteico no alterado, y se consideran como equivalentes funcionales. Tal como se usa en la presente, el término "sustitución conservadora" se refiere al reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Es un hecho bien conocido en el arte que los aminoácidos del mismo grupo conservador típicamente se pueden sustituir entre sí sin afectar sustancialmente la función de una proteína. De acuerdo con determinadas formas de realización, el derivado, los equivalentes, las variantes o los mutantes del dominio de unión a ligando de un péptido inmunogénico MAGEA1 son polipéptidos que son por lo menos 85% homólogos de la secuencia de un péptido inmunogénico MAGEA1 descrito en la presente, o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, la homología es de por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o más.

Los péptidos inmunogénicos comprendidos en la presente invención pueden comprender un epítopo peptídico derivado de una proteína MAGEA1, tal como los que se enumeran en la Tabla 1, tal como la Tabla 1A. En algunas formas de realización, el péptido inmunogénico es de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, las secuencias de aminoácidos del péptido están modificadas, que pueden incluir mutaciones conservadoras o no conservadoras. Un péptido puede comprender como máximo 1, 2, 3, 4 o más mutaciones. En algunas formas de realización, el péptido puede comprender por lo menos 1, 2, 3, 4 o más mutaciones.

En algunas formas de realización, el péptido puede estar modificado químicamente. Por ejemplo, el péptido se puede mutar para modificar las propiedades de los péptidos, tales como la detectabilidad, estabilidad, biodistribución, farmacocinética, vida media, carga de superficie, hidrofobicidad, sitios de conjugación, pH, función y semejantes. La N-metilación es un ejemplo de metilación que puede tener lugar en un péptido de la divulgación. En algunas formas de realización, el péptido se puede modificar mediante metilación en las aminas libres, tal como mediante metilación reductora con formaldehído y cianoborohidruro de sodio.

Una modificación química puede comprender un polímero, un poliéter, polietilenglicol, un biopolímero, un polímero zwiteriónico, un poliaminoácido, un ácido graso, un dendrímero, una

región Fc, una cadena carbonada saturada simple tal como palmitato o miristolato, o albúmina. La modificación química de un péptido con una región Fc puede ser un péptido de fusión Fc. Un poliaminoácido puede incluir, por ejemplo, una secuencia de poliaminoácidos con aminoácidos individuales repetidos (por ejemplo, poliglicina), y una secuencia de poliaminoácidos con secuencias de poliaminoácidos mixtos que pueden seguir, o no, un patrón, o cualquier combinación de los precedentes. En algunas formas de realización, los péptidos comprendidos en la presente divulgación se pueden modificar de manera tal que la modificación aumenta la estabilidad y/o la vida media de los péptidos. En algunas formas de realización, la unión de una unidad hidrofóbica, tal como al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a un aminoácido interno, se puede usar para extender la vida media de un péptido comprendido en la presente divulgación. En otras formas de realización, el péptido puede incluir modificaciones de postraducción (por ejemplo, metilación y/o amidación), que pueden afectar, por ejemplo, la vida media en suero. En algunas formas de realización, se pueden conjugar cadenas carbonadas simples (por ejemplo, mediante miristoilación y/o palmitilación) con las proteínas o péptidos de fusión. En algunas formas de realización, las cadenas carbonadas simples pueden volver a las proteínas o péptidos de fusión fácilmente separables del material no conjugado. Por ejemplo, los métodos que se pueden usar para separar las proteínas o los péptidos de fusión del material no conjugado incluyen, pero en un sentido no taxativo, extracción con solvente y cromatografía de fase reversa. Las unidades lipofílicas pueden extender la vida media por medio de una unión reversible a albúmina de suero. Las unidades conjugadas pueden ser unidades lipofílicas que extienden la vida media de los péptidos por medio de una unión reversible a albúmina de suero. En algunas formas de realización, la unidad lipofílica puede ser colesterol o un derivado de colesterol, inclusive colestenos, colestanos, colestadienos y oxiesteroles. En algunas formas de realización, los péptidos se pueden conjugar con ácido mirístico (ácido tetradecanoico) o un derivado del mismo. En otras formas de realización, el péptido se puede acoplar (por ejemplo, conjugar) a un agente modificador de la vida media. Los ejemplos de agentes modificadores de la vida media incluyen, pero en un sentido no taxativo: un polímero, un polietilenglicol (PEG), un almidón de hidroxietilo, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua, un polímero zwiteriónico soluble en agua, un poli(aminoácido) soluble en agua, un polímero de prolina, alanina y serina soluble en agua, un polímero soluble en agua que contiene glicina, ácido

glutámico y serina, una región Fc, un ácido graso, ácido palmítico, o una molécula que se une a albúmina. En algunas formas de realización, se puede acoplar un espaciador o conector a un péptido, tal como 1, 2, 3, 4 o más residuos de aminoácidos, que sirven como un espaciador o conector con el fin de facilitar la conjugación o fusión a otra molécula, así como para facilitar la escisión del péptido de dichas moléculas conjugadas o fusionadas. En algunas formas de realización, las proteínas o los péptidos de fusión se pueden conjugar con otras unidades que pueden, por ejemplo, modificar o efectuar cambios en las propiedades de los péptidos.

En algunas formas de realización, el péptido puede estar unido de manera covalente a una unidad. En algunas formas de realización, la unidad unida de manera covalente comprende una etiqueta o marca de afinidad. La marca de afinidad se puede seleccionar del grupo que consiste en glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a calmodulina (CBP), una marca de proteína C, una marca Myc, una marca Halo, una marca HA, una marca Flag®, una marca His, una marca de biotina y una marca V5. La marca puede ser una proteína fluorescente. En algunas formas de realización, la unidad unida de manera covalente se selecciona del grupo que consiste en un agente inflamatorio, un agente antiinflamatorio, una citoquina, una toxina, una molécula citotóxica, un isótopo radioactivo o un anticuerpo tal como un Fv de cadena simple.

El péptido se puede conjugar a un agente usado en el diagnóstico por imágenes, investigación, terapia terapéutica, técnica teranóstica, terapia farmacéutica, quimioterapia, terapia de quelación, administración dirigida de fármacos y una radioterapia. En algunas formas de realización, el péptido se puede conjugar o fusionar con agentes detectables, tales como un fluoróforo, un indicador del infrarrojo cercano, un agente de contraste, una nanopartícula, una nanopartícula que contiene un metal, un quelato de metales, un agente de contraste para rayos X, un agente para PET, un metal, un radioisótopo, un indicador, un quelante de radionúclidos u otro material adecuado que se puede usar en el diagnóstico por imágenes. En algunas formas de realización, se pueden unir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más unidades detectables a un péptido. Los ejemplos no taxativos de radioisótopos incluyen emisores de radiación alfa, emisores de radiación beta, emisores de positrones y emisores de radiación gamma. En algunas formas de realización, el metal o radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio, cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio, polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio,

talio e itrio. En algunas formas de realización, el metal es actinio, bismuto, plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas formas de realización, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212. En algunas formas de realización, los tejidos y fluidos biológicos no extinguen fácilmente los colorantes del infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el fluoróforo es un agente fluorescente que emite radiación electromagnética a una longitud de onda de entre 650 nm y 4000 nm, y dichas emisiones se usan para detectar un agente tal. Los ejemplos no taxativos de colorantes fluorescentes que se pueden usar como molécula de conjugación incluyen DyLight®-680, DyLight®-750, VivoTag®-750, DyLight®-800, IRDye®-800, VivoTag®-680, Cy5,5, ZQ800 o indocianina verde (ICG). En algunas formas de realización, los colorantes del infrarrojo cercano a menudo incluyen colorantes de cianina (por ejemplo, Cy7, Cy5,5 y Cy5). Adicionalmente, los ejemplos no taxativos de colorantes fluorescentes para usar como molécula de conjugación en la presente divulgación incluyen acradina naranja o amarilla, Alexa Fluors® (por ejemplo, Alexa Fluor® 790, 750, 700, 680, 660 y 647) y cualquier derivado de las mismas, 7-actinomicina D, ácido 8-anilinonaftalen-1-sulfónico, un indicador ATTO y cualquier derivado del mismo, tinción con auramina-rodamina y cualquier derivado de las mismas, bensantrona, bimano, 9-10-bis(feniletinil)antraceno, 5,12-bis(feniletinil)naftaceno, bisbencimida, Brainbow, calceína, carboxifluoresceína y cualquier derivado de los mismos, 1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno y cualquier derivado de los mismos, DAPI, DiOC6, DyLight Fluors y cualquier derivado de los mismos, epicocconona, bromuro de etidio, FlAsH-EDT2, indicador Fluo y cualquier derivado de los mismos, FluoProbe y cualquier derivado de los mismos, fluoresceína y cualquier derivado de la misma, Fura y cualquier derivado del mismo, GelGreen y cualquier derivado del mismo, GelRed y cualquier derivado del mismo, proteínas fluorescentes y cualquier derivado de las mismas, proteínas de la isoforma m y cualquier derivado de las mismas tal como por ejemplo, mCherry, indicador de hetametina y cualquier derivado de la misma, tintura de Hoeschst, iminocoumarina, amarillo indio, indo-1 y cualquier derivado del mismo, Laurdan, amarillo Lucifer y cualquier derivado de los mismos, luciferina y cualquier derivado de la misma, luciferasa y cualquier derivado de la misma, mercocianina y cualquier derivado de la misma, colorantes del Nilo y cualquier derivado de los mismos, perileno, floxina, indicador fico y cualquier derivado del mismo, ioduro de propidio, piranina, rodamina y cualquier derivado de los mismos, Ribogreen, RoGFP, rubreno, estilbeno y cualquier derivado de los mismos, sulforodamina y cualquier derivado de

la misma, SYBR™ y cualquier derivado del mismo, Synapto-pHluorin, tetrafenilbutadieno, Tris tetrasódico, rojo Texas, amarillo Titan, TSQ, umbeliferona, violantrona, proteína fluorescente amarilla y YOYO-1. Otros colorantes fluorescentes adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, fluoresceína y colorantes de fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína isotiocianina o FITC, naftofluoresceína, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína o FAM, etc.), carbocianina, merocianina, colorantes de estirilo, colorantes de oxonol, ficoeritrina, ertrosina, eosina, colorantes de rodamina (por ejemplo, carboxitetrametil-rodamina o TAMRA, carboxirodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), lissamina rodamina B, rodamina 6G, rodamina Verde, rodamina Roja, tetrametilrodamina (TMR), etc.), coumarina y colorantes de coumarina (por ejemplo, metoxicoumarina, dialquilaminocoumarina, hidroxicoumarina, aminometilcoumarina (AMCA), etc.), colorantes Oregon Green® (por ejemplo, Oregon Green® 488, Oregon Green® 500, Oregon Green® 514., etc.), Texas Red, Texas Red-X, SPECTRUM RED, SPECTRUM GREEN, colorantes de cianina (por ejemplo, CY-3, Cy-5, CY-3,5, CY-5,5, etc.), colorantes ALEXA FLUOR® (por ejemplo, ALEXA FLUOR® 350, ALEXA FLUOR® 488, ALEXA FLUOR® 532, ALEXA FLUOR® 546, ALEXA FLUOR® 568, ALEXA FLUOR® 594, ALEXA FLUOR® 633, ALEXA FLUOR® 660, ALEXA FLUOR® 680, etc.), colorantes BODIPY® (por ejemplo, BODIPY® FL, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 564/570, BODIPY® 576/589, BODIPY® 581/591, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, etc.), colorantes IRD (por ejemplo, IRD40, IRD 700, IRD 800, etc.) y semejantes. En PCT/US14/56177 se describen agentes detectables adecuados adicionales. Los ejemplos no taxativos de radioisótopos incluyen emisores de radiación alfa, emisores de radiación beta, emisores de positrones y emisores de radiación gamma. En algunas formas de realización, el metal o radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio, cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio, polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio, talio e itrio. En algunas formas de realización, el metal es actinio, bismuto, plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas formas de realización, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212.

El péptido se puede conjugar con un radiosensibilizador o un fotosensibilizador. Los ejemplos de radiosensibilizadores incluyen, pero en un sentido no taxativo: ABT-263, ABT-199, WEHI-539, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, gemcitabina, etanidazol, misonidazol, tirapazamina y derivados de bases de ácido nucleico (por ejemplo, purinas o pirimidinas

halogenadas, tal como 5-fluorodesoxiuridina). Los ejemplos de fotosensibilizadores incluyen, pero en un sentido no taxativo: moléculas o esferas fluorescentes que generan calor cuando se las ilumina, nanopartículas, porfirinas y derivados de porfirina (por ejemplo, clorinas, bacterioclorinas, isobacterioclorinas, ftalocianinas y naftalocianinas), metaloporfirinas, metaloftalocianinas, angelicinas, colorantes de chalcogenapirrilio, clorofilas, coumarinas, flavinas y compuestos relacionados tales como aloxazina y riboflavina, fullerenos, feofórbidos, pirofeofórbidos, cianinas (por ejemplo, merocianina 540), feofitinas, sapfirinas, texafirinas, purpurinas, porficenos, fenotiazinios, derivados de azul de metileno, naftalimidas, derivados de azul Nilo, quinonas, perilenquinonas (por ejemplo, hipericinas, hipocrellinas y cercosporinas), psoralenos, quinonas, retinoides, rodaminas, tiofenos, verdinas, colorantes de xanteno (por ejemplo, eosinas, eritrosinas, rosa Bengalas), formas diméricas y oligoméricas de porfirinas, y profármacos tal como el ácido 5-aminolevulínico. Ventajosamente, este enfoque permite un direccionalmente altamente específico de las células de interés (por ejemplo, células inmunológicas) usando un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco) y energía electromagnética (por ejemplo, radiación o luz) de manera concurrente. En algunas formas de realización, el péptido se fusiona o se une de manera covalente o de manera no covalente al agente, por ejemplo, directamente o por medio de un conector.

En algunas formas de realización, la proteína de unión se puede modificar químicamente. Por ejemplo, la proteína de unión se puede mutar para modificar las propiedades de los péptidos, tales como la detectabilidad, estabilidad, biodistribución, farmacocinética, vida media, carga de superficie, hidrofobicidad, sitios de conjugación, pH, función y semejantes. La N-metilación es un ejemplo de metilación que puede tener lugar en una proteína de unión incluida en la presente invención. En algunas formas de realización, la proteína de unión se puede modificar mediante metilación en aminas libres, tal como mediante metilación reductora con formaldehído y cianoborohidruro de sodio.

Una modificación química puede comprender un polímero, un poliéter, polietilenglicol, un biopolímero, un polímero zwiteriónico, un poliaminoácido, un ácido graso, un dendrímero, una región Fc, una cadena carbonada saturada simple tal como palmitato o miristolato, o albúmina. La modificación química de una proteína de unión con una región Fc puede ser una proteína de fusión Fc. Un poliaminoácido puede incluir, por ejemplo, una secuencia de poliaminoácidos con aminoácidos individuales repetidos (por ejemplo, poliglicina), y una

secuencia de poliaminoácidos con secuencias de poliaminoácidos mixtos que pueden seguir, o no, un patrón, o cualquier combinación de los precedentes.

En algunas formas de realización, se pueden modificar las proteínas de unión incluidas en la presente invención. En algunas formas de realización, las modificaciones tienen una identidad de secuencia sustancial o significativa con una proteína de unión parental como para generar una variante funcional que mantiene una o más actividades biofísicas y/o biológicas de la proteína de unión parental (por ejemplo, mantiene la especificidad de unión a pMCH). En algunas formas de realización, la mutación es una sustitución de aminoácido conservadora.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión incluidas en la presente invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Dichos aminoácidos sintéticos son bien conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexancarboxílico, norleucina, ácido α-amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β-fenilserina β-hidroxifenilalanina, fenilglicina, α-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, ácido aminomalónico monoamida, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido a-aminociclopentancarboxílico, ácido oc-aminociclohexancarboxílico, ácido a-aminocicloheptancarboxílico, ácido a-(2-amino-2-norbornan)-carboxílico, ácido α,γ-diaminobutírico, ácido α,β-diaminopropiónico, homofenilalanina y α-ter-butilglicina.

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

En algunas formas de realización, la unión de una unidad hidrofóbica, tal como al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a un aminoácido interno, se puede usar para extender la vida media de un péptido comprendido en la presente invención. En otras formas de realización, la proteína de unión puede incluir modificaciones de postraducción (por ejemplo, metilación y/o amidación), que pueden afectar, por ejemplo, la vida media en suero. En algunas formas de realización, se pueden conjugar cadenas carbonadas simples (por ejemplo, mediante miristoilación y/o palmitilación) con las proteínas de unión. En algunas formas de realización, las cadenas carbonadas simples pueden volver a las proteínas de unión fácilmente

separables del material no conjugado. Por ejemplo, los métodos que se pueden usar para separar las proteínas de unión del material no conjugado incluyen, pero en un sentido no taxativo, extracción con solvente y cromatografía de fase reversa. Las unidades lipofílicas pueden extender la vida media por medio de una unión reversible a albúmina de suero. Las unidades conjugadas pueden ser unidades lipofílicas que extienden la vida media de los péptidos por medio de una unión reversible a albúmina de suero. En algunas formas de realización, la unidad lipofílica puede ser colesterol o un derivado de colesterol, inclusive colestenos, colestanos, colestadienos y oxiesteroles. En algunas formas de realización, las proteínas de unión se pueden conjugar con ácido mirístico (ácido tetradecanoico) o un derivado del mismo. En otras formas de realización, la proteína de unión se puede acoplar (por ejemplo, conjugar) a un agente modificador de la vida media. Los ejemplos de agentes modificadores de la vida media incluyen, pero en un sentido no taxativo: un polímero, un polietilenglicol (PEG), un almidón de hidroxietilo, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua, un polímero zwiteriónico soluble en agua, un poli(aminoácido) soluble en agua, un polímero de prolina, alanina y serina soluble en agua, un polímero soluble en agua que contiene glicina, ácido glutámico y serina, una región Fc, un ácido graso, ácido palmítico, o una molécula que se une a albúmina. En algunas formas de realización, se puede acoplar un espaciador o conector a una proteína de unión, tal como 1, 2, 3, 4 o más residuos de aminoácidos, que sirven como un espaciador o conector con el fin de facilitar la conjugación o fusión a otra molécula, así como para facilitar la escisión del péptido de dichas moléculas conjugadas o fusionadas. En algunas formas de realización, las proteínas de unión se pueden conjugar con otras unidades que pueden, por ejemplo, modificar o efectuar cambios en las propiedades de las proteínas de unión.

Una proteína, tal como un péptido, se puede producir de manera recombinante o mediante síntesis, tal como mediante síntesis de péptidos en fase sólida o síntesis de péptidos en fase solución. La síntesis de proteínas se puede efectuar mediante métodos de síntesis conocidos, tal como usando química de fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) o química de butiloxicarbonilo (Boc). Los fragmentos de proteínas se pueden unir entre sí enzimáticamente o mediante síntesis.

En un aspecto de la presente invención, aquí se proveen métodos para producir una proteína de unión descrita en la presente, que comprende los pasos de: (i) cultivar una célula huésped

transformada que ha sido transformada mediante un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión; y (ii) recuperar la proteína de unión expresada.

Los métodos que son de utilidad para aislar y purificar la proteína de unión producida de manera recombinante pueden incluir, a modo de ejemplo, obtener los sobrenadantes de sistemas de célula huésped/vector adecuados que secretan la proteína de unión hacia el medio de cultivo y luego concentrar el medio usando un filtro disponible comercialmente. Después de la concentración, el concentrado se puede aplicar a una sola matriz de purificación adecuada o a una serie de matrices adecuadas, tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Se puede emplear uno o más pasos de HPLC de fase reversa para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante. Estos métodos de purificación también se pueden emplear para aislar un inmunógeno de su entorno natural. Los métodos de una producción a gran escala de una o más de las proteínas de unión que se describen en la presente incluyen cultivo celular por lotes, que se monitorea y controla para mantener las condiciones de cultivo apropiadas. La purificación de la proteína de unión se puede efectuar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente y que son conocidos en el arte.

En algunas formas de realización, en la presente se provee un ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico MAGEA1 descrito en la presente o un fragmento del mismo, tal como una molécula de ADN que codifica un péptido inmunogénico MAGEA1. En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica un péptido inmunogénico MAGEA1 que se describe en la presente o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, el ácido nucleico incluye los elementos reguladores necesarios para la expresión del marco de lectura abierto. Dichos elementos pueden incluir, por ejemplo, un promotor, un codón de inicio, un codón de terminación y una señal de poliadenilación. Además, se pueden incluir potenciadores. Estos elementos se pueden ligar operativamente a una secuencia que codifica el polipéptido inmunogénico MAGEA1 o un fragmento del mismo. Los vectores, promotores, elementos reguladores y semejantes representativos que son de utilidad para expresar proteínas, tal como un péptido, se describirán más adelante.

III. Complejos de MHC-péptido

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

Las proteínas MHC se pueden conjugar con un agente, tal como una unidad de detección, un radiosensibilizador, un fotosensibilizador y semejantes, y/o se pueden modificar químicamente como se describió antes con respecto a péptidos.

Las proteínas MHC provistas y usadas en las composiciones y los métodos comprendidos en la presente divulgación pueden comprender cualquiera de las moléculas de MHC adecuadas conocidas en el arte. En general, son de la fórmula $(\alpha\text{-}\beta\text{-}P)_n$, donde n es por lo menos 2, por ejemplo, entre 2-10, por ejemplo, 4.α es una cadena α de la proteína MHC de clase I o clase II. β es una cadena β, definida en la presente como la cadena β de una proteína MHC de clase II o una microglobulina β_2 para una proteína MHC clase I. P es un antígeno peptídico.

En algunas formas de realización, las proteínas MHC son complejos MHC de clase I, tales como complejos HLA I.

Las proteínas MHC pueden ser de cualquier especie de mamífero o ave, por ejemplo, primate sp., en particular humanos; roedores, que incluyen ratones, ratas y hámsteres; conejos; equinos, bovinos, caninos, felinos; etc. Por ejemplo, la proteína MHC puede derivar de las proteínas HLA humanas o las proteínas H-2 de murinos. Las proteínas HLA incluyen las subunidades de clase II HLA-DPα, HLA-DPβ, HLA-DQα, HLA-DQβ, HLA-DRα y HLA-DRβ, y las proteínas de clase I HLA-A, HLA-B, HLA-C y microglobulina β2. Las proteínas H-2 incluyen las subunidades de clase I H-2K, H-2D, H-2L, y las subunidades de clase II I-Aα, I-Aβ, I-Eá y I-Eβ y microglobulina β2. Las secuencias de algunas proteínas MHC representativas se pueden consultar en Kabat *y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Publicación del NIH Nº 91-3242, páginas 724-815. Las subunidades de la proteína MHC adecuadas para usar en la presente invención son una forma soluble de la proteína normalmente unida a membrana, que se prepara como es sabido en el arte, por ejemplo, mediante supresión del dominio transmembrana y el dominio citoplasmático.

Para las proteínas de clase I, la forma soluble puede incluir los dominios α1, α2 y α3. Las subunidades solubles clase II pueden incluir los dominios α1 y α2 para la subunidad α, y los

dominios β1 y β2 para la subunidad β.

Las subunidades α y β se pueden producir por separado y se puede dejar que se asocien *in vitro* para formar un complejo de heterodúplex estable, o ambas subunidades se pueden expresar en una sola célula. Los métodos para producir subunidades MHC son conocidos en el arte.

En determinadas formas de realización, el complejo MHC-péptido comprende un epítopo peptídico seleccionado de la Tabla 1 y un MHC. En algunas formas de realización, la molécula de MHC comprende una cadena alfa de MHC que es de un serotipo de HLA-A*01, opcionalmente en donde el alelo de HLA es HLA-A*01:01. En algunas formas de realización, el complejo MHC-péptido comprende un epítopo peptídico seleccionado de la Tabla 1A y un MHC cuya cadena alfa tiene un serotipo HLA-A*01, tal como el codificado por un alelo HLA-A*01:01.

Para preparar el complejo de MHC-péptido, las subunidades se pueden combinar con un péptido antigénico y se puede dejar que se plieguen *in vitro* para formar un complejo de heterodímeros estable con dominios unidos mediante puentes disulfuro intracatenarias. El péptido se puede incluir en la reacción de plegamiento inicial, o se puede agregar al heterodímero vacío en un paso posterior. En las composiciones y los métodos comprendidos en la presente invención, se trata de un péptido inmunogénico MAGEA1 o un fragmento del mismo. Las condiciones que permiten el plegado y la asociación de las subunidades y el péptido son conocidas en el arte. A modo de un ejemplo, se pueden mezclar cantidades aproximadamente equimolares de las subunidades α y β solubilizadas en una solución de urea. El replegado comienzo mediante dilución o diálisis en una solución amortiguada sin urea. Los péptidos se pueden cargar en heterodímeros clase II vacíos, aproximadamente a un valor de pH de entre 5 y 5,5 durante aproximadamente 1 a 3 días, seguido por neutralización, concentración e intercambio de solución amortiguadora. Sin embargo, las condiciones de plegado específicas no son críticas para la práctica de la invención.

El complejo monomérico (α-β-P) (monómero en la presente) se puede multimerizar, por ejemplo, en un tetrámero de MHC. El multímero resultante es estable sobre períodos de tiempo prolongados. Preferiblemente, el multímero se puede formar mediante la unión de los monómeros en una entidad multivalente en sitios de unión específicos en la subunidad α o β, como se conoce en el arte (por ejemplo, como se describe en la Patente de los EEUU N°:

5.635.363). Las proteínas del MHC, ya sea en sus formas monomérica o multimérica, también se pueden conjugar con esferas o con cualquier otro soporte.

El complejo multimérico se puede marcar, para que sea detectable de manera directa cuando se utiliza en una inmunotinción o en otros métodos conocidos en el arte, o se puede usar junto con reactivos inmunológicos secundarios marcados que se unen de manera específica y/o selectiva al complejo (por ejemplo, se une a una subunidad de la proteína MHC) como es conocido en el arte. Por ejemplo, la marca detectable puede ser un fluoróforo, tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, rojo Texas, ficoeritrina (PE), aloficocianina (APC), Brilliant Violet™ 421, Brilliant UV™ 395, Brilliant Violet™ 480, Brilliant Violet™ 421 (BV421), Brilliant Blue™ 515, APC-R700 o APC-Fire750. En algunas formas de realización, el complejo multimérico se marca con una unidad capaz de unirse de manera específica o selectiva a otra unidad. Por ejemplo, la marca puede ser biotina, estreptavidina, un oligonucleótido o un ligando. Otras marcas de interés pueden incluir fluorocromos, colorantes, enzimas, marcas quimioluminiscentes, partículas, radioisótopos u otro agente detectable de manera directa o indirecta.

En algunas formas de realización, una célula presentadora de péptidos inmunogénicos en el contexto de una molécula del MHC sobre la superficie celular se genera mediante transfección o transducción de la célula con un vector (por ejemplo, un vector viral) que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno recombinante o heterólogo en una célula. En algunas formas de realización, el vector se introduce en la célula en condiciones en las cuales uno o más antígenos peptídicos, incluyendo, en algunos casos, uno o más antígenos peptídicos de la proteína heteróloga expresada, serán expresados por la célula, procesados y presentados sobre la superficie de la célula en el contexto de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

En general, la célula con la cual tomará contacto el vector es una célula que expresa MHC, es decir, son células que expresan MHC. La célula puede ser una célula que normalmente expresa un MHC sobre la superficie celular, que es inducida para expresar y/o sobreexpresar la expresión del MHC sobre la superficie celular o que está modificada para expresar una molécula del MHC sobre la superficie celular. En algunas formas de realización, el MHC contiene un sitio de unión a péptido polimórfico o hendidura de unión que, en algunos casos, puede formar un complejo con antígenos peptídicos de polipéptidos, que incluyen antígenos

peptídicos procesados por la maquinaria celular. En algunos casos, las moléculas del MHC se pueden presentar o expresar sobre la superficie celular, inclusive como un complejo con un péptido, es decir, un complejo de MHC-péptido, para la presentación de un antígeno en una conformación que sea reconocible por los TCR sobre las células T, u otras moléculas de unión a péptido.

En algunas formas de realización, la célula es una célula nucleada. En algunas formas de realización, la célula es una célula presentadora de antígeno. En algunas formas de realización, la célula es un macrófago, una célula dendrítica, una célula B, una célula endotelial o un fibroblasto. En algunas formas de realización, la célula es una célula endotelial, tal como una línea de células endoteliales o una célula endotelial primaria. En algunas formas de realización, la célula es un fibroblasto, tal como una línea celular de fibroblastos o un fibroblasto primario.

En algunas formas de realización, la célula es una célula presentadora de antígeno artificial (aAPC). Típicamente, las aAPC incluyen las características de las APC naturales, inclusive la expresión de una molécula del MHC, molécula(s) estimulante(s) y coestimulante(s), un receptor Fc, molécula(s) de adhesión y/o la capacidad para producir o secretar citoquinas (por ejemplo, IL-2). Normalmente, una APC es una línea celular que carece de expresión de uno o más de los precedentes, y se genera mediante introducción (por ejemplo, mediante transfección o transducción) de uno o más de los elementos que faltan entre una molécula del MHC, un receptor Fc de baja afinidad (CD32), un receptor Fc de alta afinidad (CD64), uno o más entre una señal coestimulante (por ejemplo, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ICOS-L, ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, un receptor de linfotoxina beta, ILT3, ILT4, 3/TR6 o un ligando de B7-H3; o un anticuerpo que se une específicamente a CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un receptor del ligando Toll o un ligando de CD83), una molécula de adhesión celular (por ejemplo, ICAM-1 o LFA-3) y/o una citoquina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, un interferón-alfa (IFN.alfa.), un interferón-beta (IFN.beta.), un interferón-gamma (IFN.gamma.), un factor de necrosis tumoral-alfa (TNF.alfa.), un factor de necrosis tumoral-beta (TNF.beta.), un factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF) y un factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF)). En algunos casos, una aAPC no expresa normalmente una molécula

del MHC, pero se puede modificar para que exprese una molécula del MHC o, en algunos casos, está inducida o se puede inducir para que exprese una molécula del MHC, tal como mediante estimulación con citoquinas. En algunos casos, en las aAPC también se puede cargar un ligando estimulante, que puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 o un anticuerpo anti-CD2. Un ejemplo de una línea celular que se puede usar como esqueleto para generar una aAPC es una línea celular K562 o una línea celular de fibroblastos. Se conocen varias aAPC en el arte, véase por ejemplo, la Patente de los EEUU N°: 8.722.400, la publicación de la Solicitud de Patente de los EEUU N°: US2014/0212446; Butler y Hirano (2014) *Immunol Rev*., 257: 10. 1111/imr.12129; Suhoshki y col., (2007) *Mol. Ther*., 15: 981-988).

Es propio del nivel de conocimiento de un experto en el arte determinar o identificar el MHC o alelo particular expresado por una célula. En algunas formas de realización, antes del contacto de las células con un vector, se puede evaluar o confirmar la expresión de una molécula del MHC particular, tal como mediante el uso de un anticuerpo específico para dicha molécula del MHC particular. Los anticuerpos contra moléculas del MHC son conocidos en el arte, tal como cualquiera de los que se describirán más adelante.

En algunas formas de realización, se pueden seleccionar las células para que expresen un alelo del MHC de una restricción de MHC deseada. En algunas formas de realización, la tipificación del MHC de las células, tales como líneas celulares, es bien conocida en el arte. En algunas formas de realización, la tipificación del MHC de las células, tales como las células primarias obtenidas de un sujeto, se puede determinar usando procedimientos bien conocidos en el arte, tal como la tipificación de un tejido usando ensayos de haplotipo molecular (BioTest ABC SSPtray, BioTest Diagnostics Corp., Denville, N.J.; SeCore Kits, Life Technologies, Grand Island, N.Y.). En algunos casos, es propio del nivel de conocimiento de un experto en el arte realizar una tipificación estándar de las células para determinar el genotipo de HLA, tal como mediante el uso de una tipificación basada en secuencias (SBT) (Adams y col., (2004) *J. Transl. Med*., 2: 30; Smith (2012) *Methods Mol Biol*., 882: 67-86). En algunos casos, es conocida la tipificación del HLA de las células, tal como de fibroblastos. Por ejemplo, la línea celular de fibroblastos de pulmón fetal humana MRC-5 es HLA-A*02:01, A29, B13, B44 Cw7 (C*0702); la línea celular de fibroblastos de prepucio humana Hs68 es HLA-A1, A29, B8, B44, Cw7, Cw16; y la línea celular WI-38 es A*68:01, B*08:01, (Solache y col., (1999) *J Immunol*,

163: 5512-5518; Ameres y col., (2013) *PloS Pathog*.; 9: e1003383). La línea celular de fibroblastos transfectante humana M1DR1/Ii/DM expresa HLA-DR y HLA-DM (Karakikes y col., (2012) *FASEB J*., 26: 4886-96).

En algunas formas de realización, las células con las cuales se pondrá en contacto el vector o en las cuales se introducirá el vector son células que fueron modificadas o transfectadas para expresar una molécula del MHC. En algunas formas de realización, las líneas celulares se pueden preparar mediante modificación genética de una línea celular parental. En algunas formas de realización, las células normalmente son deficientes en la molécula del MHC particular y se modifican para expresar dicha molécula del MHC particular. En algunas formas de realización, las células se modifican genéticamente usando técnicas de ADN recombinante.

En algunas formas de realización, los complejos de MHC-péptido estables que se describen en la presente se usan para detectar las células T que se unen a un complejo de MHC-péptido estable. En algunas formas de realización, los complejos de MHC-péptido estables que se describen en la presente se usan para monitorear la respuesta de células T en un sujeto, por ejemplo, mediante detección de la cantidad y/o el porcentaje de células T (por ejemplo, células T CD8+) que se unen específicamente y/o selectivamente a los complejos de MHC-péptido que están marcados con fluorescencia. Los métodos para generar, marcar y usar los complejos de MHC-péptido (por ejemplo, los tetrámeros de MHC-péptido) para detectar las células T específicas del complejo de MHC-péptido son conocidos en el arte. Se puede consultar una descripción adicional, por ejemplo, en la Patente de los EEUU N°: 7.776.562; la Patente de los EEUU N°: 8.268.964; y la publicación de Patente de los EEUU N°: 2019/0085048.

IV. Composiciones inmunogénicas

En algunos aspectos, en la presente se proveen composiciones farmacéuticas (por ejemplo, una composición de vacuna) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 y/o un ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico MAGEA1 y un adyuvante. En algunos aspectos, en la presente se proveen composiciones farmacéuticas (por ejemplo, una composición de vacuna) que comprende un complejo de MHC-péptido estable que comprende un péptido inmunogénico de MAGEA1 en el contexto de una molécula del MHC y un adyuvante. En algunas formas de realización, la composición incluye una combinación de

múltiples (por ejemplo, dos o más) péptidos inmunogénicos o ácidos nucleicos de MAGEA1 y un adyuvante. En algunas formas de realización, la composición incluye una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) complejos de MHC-péptido estables que comprende un péptido inmunogénico de MAGEA1 en el contexto de una molécula del MHC y un adyuvante. En algunas formas de realización, la composición descrita antes comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente se pueden formular especialmente para una administración en una forma sólida o líquida, inclusive aquellas adaptadas para lo que sigue: (1) administración oral, por ejemplo, suspensiones orales (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellas buscadas para una absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicar sobre la lengua; o (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural, por ejemplo, como una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida.

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

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

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (tal como glicerol, propilenglicol,

polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tal como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula deseado en el caso de las dispersiones y por medio del uso de agentes tensioactivos.

De manera independiente de la ruta de administración seleccionada, los agentes provistos en la presente, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en el arte.

En algunas formas de realización, cuando la composición farmacéutica descrita se administra a un sujeto, puede generar una respuesta inmunológica contra una célula que está infectada con MAGEA1. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser de utilidad como vacunas para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de trastornos caracterizados por la expresión de MAGEA1.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante fisiológicamente aceptable. En algunas formas de realización, el adyuvante empleado provee una mayor inmunogenicidad de la composición farmacéutica. Dicho compuesto o adyuvante estimulante adicional de la respuesta inmunológica puede (i) mezclarse con la composición farmacéutica de acuerdo con la invención después de la reconstitución de los péptidos y una emulsión opcional con un adyuvante basado en aceite definido antes, (ii) formar parte de la composición reconstituida de la invención definida antes, (iii) unirse físicamente a uno o más péptido(s) a reconstituir o (iv) administrarse por separado al sujeto, mamífero o humano que será tratado. El adyuvante puede ser uno que provee una liberación lenta del antígeno (por ejemplo, el adyuvante puede ser un liposoma), o puede ser un adyuvante que sea inmunogénico por sí mismo funcionando así de manera sinérgica con antígenos (es decir, los antígenos presentes en el péptido inmunogénico de MAGEA1). Por ejemplo, el adyuvante puede ser un adyuvante conocido u otra sustancia que promueva la captación de antígenos, reclute células del sistema inmunológico hacia el sitio de la administración o facilite la activación inmunológica de las células linfoides respondedoras. Los adyuvantes incluyen, pero en un sentido no taxativo, moléculas inmunomoduladoras (por

ejemplo, citoquinas), emulsiones de aceite y agua, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, Bacto-Adyuvante, polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, aceite de parafina y muramilo dipéptido. En algunas formas de realización, el adyuvante es el Adyuvante 65, α-GalCer, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, péptido β-glucano, CpG DNA, GM-CSF, GPI-0100, IFA, IFN-γ, IL-17, lípido A, lipopolisacárido, Lipovant, Montanide, N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, Pam3CSK4, Quil A, dimicolato de trehalosa o zimosán.

En algunas formas de realización, el adyuvante es una molécula inmunomoduladora. Por ejemplo, la molécula inmunomoduladora puede ser una proteína recombinante, una citoquina, una quimioquina o un agente o ácido nucleico inmunoestimulante que codifica citoquinas, quimioquinas o agentes inmunoestimulantes diseñados para mejorar la respuesta inmunológica.

Los ejemplos de citoquinas inmunomoduladoras incluyen interferones (por ejemplo, IFNα, IFNβ e IFNγ), interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17 e IL-20), factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNFα y TNFβ), eritropoyetina (EPO), el ligando FLT-3, gIp10, TCA-3, MCP-1, MIF, MIP-1.alfa., MIP-1β, Rantes, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), así como fragmentos funcionales de cualquiera de ellos.

En algunas formas de realización, también se puede incluir una quimioquina inmunomoduladora que se una a un receptor de quimioquina, es decir, un receptor de una quimioquina CXC, CC, C o CX3C, en las composiciones provistas en la presente. Los ejemplos de quimioquinas incluyen, pero en un sentido no taxativo, Mip1α, Mip-1β, Mip-3α (Larc), Mip-3β, Rantes, Hcc-1, Mpif-1, Mpif-2, Mcp-1, Mcp-2, Mcp-3, Mcp-4, Mcp-5, Eotaxina, Tarc, Elc, I309, IL-8, Gcp-2 Gro-α, Gro-β, Gro-γ, Nap-2, Ena-78, Gcp-2, Ip-10, Mig, I-Tac, Sdf-1 y Bca-1 (Blc), así como fragmentos funcionales de cualquiera de ellas.

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

Cuando es captado por una célula (por ejemplo, una célula huésped, una célula presentadora de antígeno (APC) tal como una célula dendrítica, macrófago, etc.), puede haber una molécula de ADN en la célula, como una molécula extracromosómica y/o se puede integrar en el cromosoma. El ADN se puede introducir en las células en la forma de un plásmido que puede permanecer como un material genético separado. Como alternativa, los ADN lineales que se pueden integrar en el cromosoma se pueden introducir en la célula. Opcionalmente, cuando se introduce ADN en una célula, se pueden agregar reactivos que promueven la integración de ADN en los cromosomas.

V. Proteínas de unión

En algunos aspectos, se provee una unidad de unión que se une a un péptido descrito en la presente y/o a un complejo de MHC-péptido estable descrito en la presente. Por ejemplo, se proveen proteínas de unión tipo receptores de células T (TCR), anticuerpos y semejantes, que se unen específicamente y/o selectivamente al péptido y/o al complejo de MHC-péptido estable, tal como con un valor de K_d menor o igual a aproximadamente 10^{-4} M (por ejemplo, aproximadamente 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, aproximadamente 10^{-8}, aproximadamente 10^{-9}, aproximadamente 10^{10}, aproximadamente 10^{-11}, aproximadamente 10^{-12}, aproximadamente 10^{-13}, aproximadamente 10^{-14}, etc.).

En un aspecto comprendido en la presente invención, se proveen aquí proteínas de unión que se unen (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula de MHC clase I). En algunas formas de realización, la proteína de unión se puede unir (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un complejo de péptido MAGEA1-MHC (pMHC) con un valor de K_d menor o igual a aproximadamente $5x10^{-4}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-4}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-5}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-5}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-6}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-6}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-7}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-7}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-8}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-8}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-9}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-9}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-10}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-10}$ M, menor o igual a aproximadamente $5x10^{-11}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-11}$ M, menor o igual a

aproximadamente $5x10^{-12}$ M, menor o igual a aproximadamente $1x10^{-12}$ M, o cualquier rango entre ellos, inclusive, tal como entre aproximadamente 1-50 micromolar, 1-100 micromolar, 0,1-500 micromolar y semejantes.. En algunas modalidades, la molécula de MHC comprende una cadena alfa de MHC que es un serotipo HLA-A*01, opcionalmente donde el alelo de HLA es HLA-A*01:01. En algunas modalidades, el serotipo de HLA es HLA-A*01 y/o el alelo HLA es el alelo HLA-A*01:01. En algunas formas de realización, las proteínas de unión provistas en la presente se modifican genéticamente, se aíslan y/o se purifican.

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

En algunas formas de realización, la proteína de unión induce una mayor expansión de células T, liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica que un receptor de células T conocido cuando se pone en contacto con células diana con expresión de MAGEA1 en un cierto nivel o por debajo del mismo (por ejemplo, para ver líneas celulares representativas que expresan MAGEA1 en diferentes niveles consúltese la sección de Ejemplos). Por ejemplo, en algunas formas de realización de cualquiera de los aspectos que se describen aquí, el nivel de MAGEA1 puede expresarse en términos de transcripciones por millón y puede ser, por ejemplo, menor o igual que aproximadamente 1,000 transcriptos por millón de transcripciones (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28

TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM, y 1 TPM, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, por ejemplo, entre menor o igual que aproximadamente 1,000 TPM y menor o igual que aproximadamente 35 TPM). En algunas formas de realización, el bajo nivel de expresión de MAGEA1 se denomina "expresión heterocigota" lo cual equivale a entre aproximadamente 1 TPM y aproximadamente 35 TPM, o cualquier rango entre estos valores, inclusive, tal como 32 TPM o 1-32 TPM. Una mayor expresión es 36 TPM y mayor. Como se describe adicionalmente en la presente, la TPM se mide de acuerdo con técnicas bien conocidas, tales como RNA-Seq, y los datos de TPM de expresión génica son bien conocidos en el arte para una variedad de líneas celulares, tipos de tejidos y demás (véase por ejemplo, *The Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) en la World Wide Web en portals.broadinstitute.org). En algunas formas de realización, la proteína de unión induce por lo menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces, o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive, por ejemplo, entre 1,2 veces y 2 veces, de aumento en la expansión de células T, liberación de citoquinas y/o muerte citotóxica que un receptor de células T conocido (por ejemplo, un TCR comparador descrito en la presente) cuando se pone en contacto con células diana que expresan un epítopo peptídico MAGEA1, tal como con una expresión heterocigota del epítopo peptídico MAGEA1.

En algunas formas de realización, la expresión de MAGEA1 se detecta usando secuenciación de ARN (RNA-seq). La RNA-seq generalmente comprende los siguientes pasos: obtener una muestra que contiene material genético, aislar el ARN total de la muestra que se obtuvo, preparar una biblioteca de ADNc amplificado del ARN total, secuenciar la biblioteca de ADNc amplificado y analizar y perfilar el ADNc amplificado para evaluar la nivel de expresión de diferentes transcripciones. La muestra puede ser una población de células, una muestra de tejido, una muestra de biopsia, un cultivo celular o una sola célula. El ARN total se puede aislar de la muestra biológica usando cualquier método conocido en el arte. En ciertas formas

de realización, el ARN total se extrae del plasma. La extracción de ARN plasmático se describe en Enders y col., "*The Concentration of Circulating Corticotropin-Releasing Homer mRNA in Material Plasma Is Inclined in Preclampsia*", *Clinr*. Como se describe allí, el plasma recogido después del paso de centrifugación se mezcla con reactivo Trizol LS (Invitrogen) y cloroformo. La mezcla se centrifuga y se transfiere la capa acuosa a un tubo nuevo. Se agrega etanol a esta capa acuosa. Luego, la mezcla se coloca en una mini columna RNeasy (Qiagen) y se procesa de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

En algunas formas de realización, la secuenciación de ARN según se describe en la presente incluye el paso de preparar ADNc amplificado a partir de ARN total. Por ejemplo, se prepara ADNc y la muestra de ARN aislada se amplifica aleatoriamente sin dilución, o la mezcla de material genético en el ARN aislado se dispersa en muestras de reacción individuales. En ciertas formas de realización, la amplificación se inicia aleatoriamente en el extremo 3' y en todo el transcriptoma de la muestra para amplificar tanto el ARNm como los transcriptos no poliadenilados. De esta manera, los productos de amplificación de ADNc de doble hebra se optimizan para la generación de bibliotecas de secuenciación para plataformas de secuenciación de nueva generación. Un kit apropiado para la amplificación de ADNc mediante el método abarcado por la presente invención incluye, por ejemplo, Ovation® RNA-Seq System.

En algunas formas de realización, la secuencia de ARN tal como se describe en la presente incluye el paso de secuenciar el ADNc amplificado. Para secuenciar la mezcla de ADNc amplificado se puede usar cualquier método de secuenciación conocido, incluyendo el método de secuenciación de una sola molécula. En ciertas formas de realización, el ADNc amplificado se secuencia mediante secuenciación rápida del transcriptoma completo. La secuenciación completa del transcriptoma se puede realizar utilizando varias plataformas de secuenciación de nueva generación, como la plataforma Illumina® Genome Analyzer, la plataforma de secuenciación ABI SOLiD™ o la plataforma de secuenciación 454 de *Life Science*.

En algunas formas de realización, la secuenciación de ARN según se describe en la presente comprende además realizar el recuento y análisis digital del ADNc. El número de secuencias amplificadas para cada transcripción en la muestra amplificada se puede cuantificar mediante lectura de secuencias (una lectura por hebra amplificada). En algunas formas de realización, la transcripción por millón (TPM) se usa para cuantificar el nivel de expresión de una

transcripción particular. El TPM se puede calcular como se muestra en Wagner y col. (2012) *Theory in BioSciences* 131: 281-285, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en toda su extensión.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión reconocen un péptido inmunogénico MAGEA1 en un complejo con moléculas de MHC, tales como moléculas de HLA particulares que tienen alelos particulares de la cadena alfa de HLA. Por ejemplo, las proteínas de unión enumeradas en la Tabla 2A se identificaron como agentes de unión de péptidos inmunogénicos MAGEA1 en asociación con un MHC cuya cadena alfa tenía un serotipo HLA-A*01, tal como el codificado por un alelo HLA-A*01:01, como se describe adicionalmente en la sección de Ejemplos. En algunas formas de realización, las proteínas de unión reconocen un complejo de péptido inmunogénico MAGEA1 y una molécula de MHC, en donde la molécula de MHC comprende una cadena alfa de MHC que es de un serotipo de HLA-A*01, opcionalmente donde el alelo HLA es HLA-A*01:01. En algunas formas de realización, los péptidos inmunogénicos MAGEA1 derivan de una proteína MAGEA1 humana y/o de una proteína MAGEA1 que se muestra en la Tabla 3. En algunas formas de realización, se administra uno o más péptidos inmunogénicos MAGEA1 solos o en combinación con un adyuvante.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión no se unen a un complejo de péptido-MHC (pMHC), opcionalmente en donde el péptido deriva de un “elemento inespecífico” descrito en la presente.

En algunas formas de realización, la proteína de unión no se une a un “elemento inespecífico” descrito en la presente en complejo con un complejo de péptido MHC-MHC (pMHC).

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en): a) una secuencia de la cadena alfa de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 %, o más de identidad con una secuencia de la cadena alfa de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias alfa de TCR que se mencionan en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de la cadena beta de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de identidad con una secuencia de la cadena beta de TCR que

se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la cadena beta de TCR que se mencionan en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en): a) una secuencia de la cadena alfa de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la cadena alfa de TCR que se mencionan en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de la cadena beta de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la cadena beta de TCR que se mencionan en la Tabla 2.

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

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en): a) una secuencia de dominio variable de la cadena alfa (V_α) de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en secuencias del dominio V_α de TCR que se mencionan en la Tabla 2; y/o b) una secuencia de dominio variable de la cadena beta (V_β) de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias del dominio V_β de TCR que se mencionan en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres, tal como CDR3 sola o en combinación con una CDR1 y CDR2)) secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena alfa de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de la CDR de la cadena alfa de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de CDR de la cadena alfa de TCR que se mencionan en la Tabla 2. Se cree que la CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado y CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC, por lo que, en algunas formas de realización, se provee la proteína de unión que comprende una CDR3 sola de una cadena alfa de TCR y/o una CDR3 sola de una cadena beta de TCR que se menciona en la Tabla 2, donde cada CDR3 tiene una homología de secuencia según se indica en este párrafo.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en) por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres, tal como CDR3 sola o en combinación con una CDR1 y CDR2) secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) de la cadena beta de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de la CDR de la cadena beta de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la CDR de la cadena beta de TCR que se mencionan en la Tabla 2. Tal como se describió anteriormente, se cree que CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el antígeno procesado y CDR1 y CDR2 interactúan principalmente con el MHC, por lo que, en algunas formas de realización, se provee la proteína de unión que comprende una CDR3 sola de una cadena beta de TCR y/o una CDR3 sola de una cadena alfa de TCR que se menciona en la Tabla 2, donde cada CDR3 tiene una homología de secuencia como se indica en este párrafo.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) región determinante de la complementariedad (CDR) de las cadenas alfa del TCR que se mencionan en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se proveen en la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en) por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) región determinante de la complementariedad (CDR) de las cadenas TCR beta que se mencionan en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente incluyen (por

ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en) una secuencia de la región constante de la cadena alfa (C_α) de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de identidad con una secuencia de la C_α de TCR que se menciona en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en) una secuencia de la región constante de la cadena beta (C_β) de TCR que tiene por lo menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de identidad con una secuencia de la Cβ de TCR que se menciona en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente incluyen (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en) una secuencia de la región constante de la cadena alfa (C_α) de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la C_α de TCR que se mencionan en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que provee la presente también pueden incluir (por ejemplo, pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en) una secuencia de la región constante de la cadena beta (C_β) de TCR que se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de la C_β de TCR que se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de TCR que reconocen un antígeno MAGEA1

Tabla 2A

Secuencias de TCR que reconocen un antígeno MAGEA1 presentado por el serotipo HLA HLA-A*01

Secuencia MAGEA1-161-458 WT

Cadena alfa:

TRAV21/TRAJ47/TRAC

Secuencia de ADN de la cadena alfa

ATGGAAACCCTGCTGGGACTGCTGATCCTGTGGCTGCAGCTTCAGTGGGTGTCCTCTAA
GCAAGAAGTGACACAGATCCCTGCCGCACTGTCTGTGCCTGAGGGCGAAAACCTGGTGC
TGAACTGCTCCTTCACC**GATAGCGCTATTTACAAC**CTGCAGTGGTTCAGACAGGACCCC
GGCAAGGGACTGACAAGCCTGCTGCTC**ATTCAGTCAAGTCAGAGAGAG**CAGACCAGCG

GCAGACTGAATGCCAGCCTGGATAAGTCCTCCGGCAGAAGCACCCTGTATATCGCCGCT
TCTCAGCCAGGCGATAGCGCCACATACCTG**TGTGCTGTCCAATATGGAAACAAGCTGGT**
CTTTGGCGCAGGAACCATTCTGAGAGTCAAGTCCTatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctga
gagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgta
tatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgc
atgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggtcgag
aaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggtttaa
tctgctcatgacgctgcggctgtggtccagc

Secuencia proteica de la cadena alfa

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFT**DSAIYN**LQWFRQDPGKGL
TSLLL**IQSSQRE**QTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYL**CAVQYGNKLVF**GAGTILR
VKSYiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsii
pedtffpspesscdvklveksfetdtnlnfqnlsvigfrilllkvagfnllmtlrlwss

Cadena beta:

TRBV5-4/TRBJ2-7/TRBC2

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGGACCCGGCCTTCTGTGTTGGGCCCTGCTTTGCCTTCTCGGAGCTGGCTCTGTGGA
AACCGGCGTGACACAGTCTCCTACACATCTGATCAAAACTCGCGGGCAACAAGTGACTCT
GCGGTGTAGCTCTCAG**TCTGGGCACAACACT**GTTTCTTGGTATCAGCAAGCTCTCGGCC
AGGGGCCACAGTTTATTTTCCAG**TATTATAGGGAGGAAGAG**AACGGCAGAGGCAACTTT
CCACCTCGGTTTTCCGGACTGCAGTTTCCCAACTACTCCTCCGAGCTGAACGTGAACGCC
TTGGAGCTGGATGATAGTGCCCTCTACCTCT**GTGCCAGCAGCACGGACATAACCTACGA**
GCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAgatctgaacaaggtgttccctccagag
gtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttccccgac
cacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctg
ccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaaccccccggaaccacttcagatg
ccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccg
aagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcct
gctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggc

Secuencia proteica de la cadena beta

MGPGLLCWALLCLLGAGSVETGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSSQ**SGHNT**VSWYQQALGQG

PQFIFQ**YYREEE**NGRGNFPPRFSGLQFPNYSSELNVNALELDDSALYL**CASSTDITYEQY**FGP
GTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalndsryclss
rlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlm
amvkrkdfgsg

Secuencia de codones optimizados de MAGEA1-161-458 MGTM (que también se conoce como clon “MAGE-A1-458”, “TCR 458”, “458”, TCR expresado por “TSC-204-A01”, TCR expresado mediante “TSC-204-A01:01” y TCR expresado por “TSC-204 -A0101”)

Cadena alfa:

TRAV21/TRAJ47/MGTM TRAC modificado

Secuencia de ADN de la cadena alfa

ATGGAAACCCTGCTGGGACTGCTGATCCTGTGGCTGCAGCTTCAGTGGGTGTCCTCTAA
GCAAGAAGTGACACAGATCCCTGCCGCACTGTCTGTGCCTGAGGGCGAAAACCTGGTGC
TGAACTGCTCCTTCACC**GACTCCGCCATCTACAAC**CTGCAGTGGTTCAGACAGGACCCC
GGCAAGGGACTGACAAGCCTGCTGCTC**ATTCAGAGCAGCCAGAGAGAG**CAGACCAGCG
GCAGACTGAATGCCAGCCTGGATAAGTCCTCCGGCAGAAGCACCCTGTATATCGCCGCT
TCTCAGCCAGGCGATAGCGCCACATACCTG**TGCGCTGTGCAATATGGGAATAAACTCGT
TTTC**GGCGCAGGAACCATTCTGAGAGTCAAGTCCTacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctg
agggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagc
gacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaag
agcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccagcagcgacgtgccctgcgacgt
gaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaa
gtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagcagc

Secuencia proteica de la cadena alfa

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFT**DSAIYN**LQWFRQDPGKGL
TSLLL**IQSSQRE**QTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYL**CAVQYGNKLVF**GAGTILR
VKSYiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsii
pedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivlrilllkvagfnllmtlrlwss

Cadena beta:

TRBV5-4/TRBJ2-7/MGTM TRBC modificado

Secuencia de ADN de la cadena beta

ATGGGACCCGGCCTTCTGTGTTGGGCCCTGCTTTGCCTTCTCGGAGCTGGCTCTGTGGA

AACCGGCGTGACACAGTCTCCTACACATCTGATCAAAACTCGCGGGCAACAAGTGACTCT
GCGGTGTAGCTCTCAG**TCCGGCCACAACACA**GTTTCTTGGTATCAGCAAGCTCTCGGCC
AGGGGCCACAGTTTATTTTCCAG**TACTACCGCGAGGAAGAG**AACGGCAGAGGCAACTTT
CCACCTCGGTTTTCCGGACTGCAGTTTCCCAACTACTCCTCCGAGCTGAACGTGAACGCC
TTGGAGCTGGATGATAGTGCCCTCTACCTC**TGCGCTTCCAGCACAGACATCACCTATGA**
GCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGaagatctgaacaaggtgttccctccagagg
tggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttccccgacc
acgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgc
cctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgc
caggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccga
agcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctg
ctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggc

Secuencia proteica de la cadena beta

MGPGLLCWALLCLLGAGSVETGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSSQ**SGHNT**VSWYQQALGQG
PQFIFQ**YYREEE**NGRGNFPPRFSGLQFPNYSSELNVNALELDDSALYL**CASSTDITYEQYF**GP
GTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalndsryclss
rlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlm
amvkrkdfgsg

Secuencia de ADN completa del ORF Beta y Alfa (la región en cursiva subrayada en el sitio “Furina-P2A” codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un solo casete)

ATGGGACCCGGCCTTCTGTGTTGGGCCCTGCTTTGCCTTCTCGGAGCTGGCTCTGTGGA
AACCGGCGTGACACAGTCTCCTACACATCTGATCAAAACTCGCGGGCAACAAGTGACTCT
GCGGTGTAGCTCTCAG**TCCGGCCACAACACA**GTTTCTTGGTATCAGCAAGCTCTCGGCC
AGGGGCCACAGTTTATTTTCCAG**TACTACCGCGAGGAAGAG**AACGGCAGAGGCAACTTT
CCACCTCGGTTTTCCGGACTGCAGTTTCCCAACTACTCCTCCGAGCTGAACGTGAACGCC
TTGGAGCTGGATGATAGTGCCCTCTACCTC**TGCGCTTCCAGCACAGACATCACCTATGA**
GCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGaagatctgaacaaggtgttccctccagagg
tggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttccccgacc
acgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgc
cctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgc

caggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccga
agcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcctg
ctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggc*ag*
agccaaaaggtccgggagcggtGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAG
*AGAACCCCGGACCT*ATGGAAACCCTGCTGGGACTGCTGATCCTGTGGCTGCAGCTTCAG
TGGGTGTCCTCTAAGCAAGAAGTGACACAGATCCCTGCCGCACTGTCTGTGCCTGAGGG
CGAAAACCTGGTGCTGAACTGCTCCTTCACC**GACTCCGCCATCTACAAC**CTGCAGTGGTT
CAGACAGGACCCCGGCAAGGGACTGACAAGCCTGCTGCTC**ATTCAGAGCAGCCAGAGA**
GAGCAGACCAGCGGCAGACTGAATGCCAGCCTGGATAAGTCCTCCGGCAGAAGCACCCT
GTATATCGCCGCTTCTCAGCCAGGCGATAGCGCCACATACCTG**TGCGCTGTGCAATATG**
GGAATAAACTCGTTTTCGGCGCAGGAACCATTCTGAGAGTCAAGTCCTacatccagaaccccga
ccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtg
agtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgc
cgtggcctggtccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccagca
gcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtg
ctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagcagc

Secuencia proteica completa del ORF de las cadenas Beta y Alfa (La región en cursiva subrayada en el sitio “Furina-P2A” permite la expresión de dos cadenas polipeptídicas en un solo casete)

MGPGLLCWALLCLLGAGSVETGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSSQ**SGHNT**VSWYQQALGQG
PQFIFQ**YYREEE**NGRGNFPPRFSGLQFPNYSSELNVNALELDDSALYL**CASSTDITYEQYF**GP
GTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalndsryclss
rlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlm
amvkrkdfgsg*rakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGP*METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAAL
SVPEGENLVLNCSFT**DSAIYN**LQWFRQDPGKGLTSLLL**IQSSQRE**QTSGRLNASLDKSSGRS
TLYIAASQPGDSATYL**CAVQYGNKLVF**GAGTILRVKSYiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqs
kdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivlrilllkvag
fnllmtlrlwss

Secuencia de MAGEA1-161-747 WT

Cadena alfa:

TRAV21/TRAJ54/TRAC

Secuencia de ADN de cadena alfa

ATGGAAACCCTGCTGGGACTGCTGATCCTGTGGCTGCAGCTTCAGTGGGTGTCCTCTAA
GCAAGAAGTGACACAGATCCCTGCCGCACTGTCTGTGCCTGAGGGCGAAAACCTGGTGC
TGAACTGCTCCTTCACC**GACTCCGCCATCTACAAC**CTGCAGTGGTTCAGACAGGACCCC
GGCAAGGGACTGACAAGCCTGCTGCTC**ATTCAGAGCAGCCAGAGAGAG**CAGACCAGCG
GCAGACTGAATGCCAGCCTGGATAAGTCCTCCGGCAGAAGCACCCTGTATATCGCCGCT
TCTCAGCCAGGCGATAGCGCCACATACCTG**TGCGCCGTCCGCCCACAGCAAGGCGCAC**
AGAAGTTGGTGTTCGGCCAAGGAACCAGGCTGACTATCAACCCAAACatccagaaccctgaccct
gccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaaagt
aaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagc
aacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaagttcctgtg
atgtcaagctggtcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctg
aaagtggccgggtttaatctgctcatgacgctgcggctgtggtccagc

Secuencia de proteínas de la cadena alfa

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFT**DSAIYN**LQWFRQDPGKGL
TSLLL**IQSSQRE**QTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYL**CAVRPQQGAQKLVF**GQG
TRLTINPNiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanaf
nnsiipedtffpspesscdvklveksfetdtnlnfqnlsvigfrilllkvagfnllmtlrlwss

Cadena beta:

TRBV5-4/TRBJ2-7/TRBC2

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGGACCCGGCCTTCTGTGTTGGGCCCTGCTTTGCCTTCTCGGAGCTGGCTCTGTGGA
AACCGGCGTGACACAGTCTCCTACACATCTGATCAAAACTCGCGGGCAACAAGTGACTCT
GCGGTGTAGCTCTCAG**TCCGGCCACAACACA**GTTTCTTGGTATCAGCAAGCTCTCGGCC
AGGGGCCACAGTTTATTTTCCAG**TACTACCGCGAGGAAGAG**AACGGCAGAGGCAACTTT
CCACCTCGGTTTTCCGGACTGCAGTTTCCCAACTACTCCTCCGAGCTGAACGTGAACGCC
TTGGAGCTGGATGATAGTGCCCTCTACCTC**TGCGCAAGCAGCCTGGACCGCACATACGA**
GCAATACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAgacctgaacaaggtgttcccacccga
ggtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttcttccctga
ccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggacccgcagcccctcaaggagcag
cccgccctcaatgactccagatactgcctgagcagccgcctgagggtctcggccaccttctggcagaaccccccgcaaccacttccg

ctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggacccaggatagggccaaacccgtcacccagatcgtcagcgcc
gaggcctggggtagagcagactgtggctttacctcggtgtcctaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcctgct
agggaaggccaccctgtatgctgtgctggtcagcgcccttgtgttgatggccatggtcaagagaaaggatttc

Secuencia de proteínas de la cadena beta

MGPGLLCWALLCLLGAGSVETGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSSQ**SGHNT**VSWYQQALGQG
PQFIFQ**YYREEE**NGRGNFPPRFSGLQFPNYSSELNVNALELDDSALYL**CASSLDRTYEQYF**G
PGTRLTVTEdlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalndsrycl
ssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgftsvsyqqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvl
mamvkrkdf

Secuencia optimizada por codones de MAGEA1-161-747 MGTM (también conocida como “MAGE-A1-747”, “TCR 747”, y “747”)

Cadena alfa:

TRAC modificado con TRAV21/TRAJ54/MGTM

Secuencia de ADN de cadena alfa

ATGGAAACCCTGCTGGGACTGCTGATCCTGTGGCTGCAGCTTCAGTGGGTGTCCTCTAA
GCAAGAAGTGACACAGATCCCTGCCGCACTGTCTGTGCCTGAGGGCGAAAACCTGGTGC
TGAACTGCTCCTTCACC**GACTCCGCCATCTACAAC**CTGCAGTGGTTCAGACAGGACCCC
GGCAAGGGACTGACAAGCCTGCTGCTC**ATTCAGAGCAGCCAGAGAGAG**CAGACCAGCG
GCAGACTGAATGCCAGCCTGGATAAGTCCTCCGGCAGAAGCACCCTGTATATCGCCGCT
TCTCAGCCAGGCGATAGCGCCACATACCTG**TGCGCCGTCCGCCCACAGCAAGGCGCAC**
AGAAGTTGGTGTTCGGCCAAGGAACCAGGCTGACTATCAACCCAAacatccagaaccccgacccc
gccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtc
aaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtg
gcctggtccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccagcagcg
acgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgc
ggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagcagc

Secuencia de proteínas de cadena alfa

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFT**DSAIYN**LQWFRQDPGKGL
TSLLL**IQSSQRE**QTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYL**CAVRPQQGAQKLVF**GQG
TRLTINPNiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanaf
nnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivlrilllkvagfnllmtlrlwss

Cadena beta:

TRBC modificado con TRBV5-4/TRBJ2-7/MGTM

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGGACCCGGCCTTCTGTGTTGGGCCCTGCTTTGCCTTCTCGGAGCTGGCTCTGTGGA
AACCGGCGTGACACAGTCTCCTACACATCTGATCAAAACTCGCGGGCAACAAGTGACTCT
GCGGTGTAGCTCTCAG**TCCGGCCACAACACA**GTTTCTTGGTATCAGCAAGCTCTCGGCC
AGGGGCCACAGTTTATTTTCCAG**TACTACCGCGAGGAAGAG**AACGGCAGAGGCAACTTT
CCACCTCGGTTTTCCGGACTGCAGTTTCCCAACTACTCCTCCGAGCTGAACGTGAACGCC
TTGGAGCTGGATGATAGTGCCCTCTACCTC**TGCGCAAGCAGCCTGGACCGCACATACGA**
GCAATACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAgatctgaacaaggtgttccctccagag
gtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttccccgac
cacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctg
ccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatg
ccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccg
aagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcct
gctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggc

Secuencia de proteínas de la cadena beta

MGPGLLCWALLCLLGAGSVETGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSSQ**SGHNT**VSWYQQALGQG
PQFIFQ**YYREEE**NGRGNFPPRFSGLQFPNYSSELNVNALELDDSALYL**CASSLDRTYEQYF**G
PGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalndsrycl
ssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvl
mamvkrkdfgsg

Secuencia de ADN del ORF beta y alfa completo (La región en cursiva subrayada en el sitio de “Furina-P2A” codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas de polipéptidos en un casete simple)

ATGGGACCCGGCCTTCTGTGTTGGGCCCTGCTTTGCCTTCTCGGAGCTGGCTCTGTGGA
AACCGGCGTGACACAGTCTCCTACACATCTGATCAAAACTCGCGGGCAACAAGTGACTCT
GCGGTGTAGCTCTCAG**TCCGGCCACAACACA**GTTTCTTGGTATCAGCAAGCTCTCGGCC
AGGGGCCACAGTTTATTTTCCAG**TACTACCGCGAGGAAGAG**AACGGCAGAGGCAACTTT
CCACCTCGGTTTTCCGGACTGCAGTTTCCCAACTACTCCTCCGAGCTGAACGTGAACGCC
TTGGAGCTGGATGATAGTGCCCTCTACCTC**TGCGCAAGCAGCCTGGACCGCACATACGA**

GCAATACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAgatctgaacaaggtgttccctccagag
gtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccggctttttccccgac
cacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctg
ccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatg
ccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaaatcgtgtctgccg
aagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcctgtacgaaatcct
gctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggactttggcagcggca
gagccaaaaggtccgggagcggt*GCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAA*
*GAGAACCCCGGACCT*ATGGAAACCCTGCTGGGACTGCTGATCCTGTGGCTGCAGCTTCA
GTGGGTGTCCTCTAAGCAAGAAGTGACACAGATCCCTGCCGCACTGTCTGTGCCTGAGG
GCGAAAACCTGGTGCTGAACTGCTCCTTCACC**GACTCCGCCATCTACAAC**CTGCAGTGG
TTCAGACAGGACCCCGGCAAGGGACTGACAAGCCTGCTGCTC**ATTCAGAGCAGCCAGA**
GAGAGCAGACCAGCGGCAGACTGAATGCCAGCCTGGATAAGTCCTCCGGCAGAAGCAC
CCTGTATATCGCCGCTTCTCAGCCAGGCGATAGCGCCACATACCTG**TGCGCCGTCCGCC**
CACAGCAAGGCGCACAGAAGTTGGTGTTCGGCCAAGGAACCAGGCTGACTATCAACCC
AAacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttc
gacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatgg
acttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccg
aggacaccttcttccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaacttt
cagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagcagc
Secuencia de proteínas de ORF de beta y alfa completo (La región en cursiva subrayada en el sitio “Furina-P2A” permite la expresión de dos cadenas de polipéptidos en un casete único)
MGPGLLCWALLCLLGAGSVETGVTQSPTHLIKTRGQQVTLRCSSQ**SGHNT**VSWYQQALGQG
PQFIFQ**YYREEE**NGRGNFPPRFSGLQFPNYSSELNVNALELDDSALYL**CASSLDRTYEQYF**G
PGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalndsrycl
ssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvl
mamvkrkdfgsgrakrsgsg*ATNFSLLKQAGDVEENPGP*METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPA
ALSVPEGENLVLNCSFT**DSAIYN**LQWFRQDPGKGLTSLLL**IQSSQRE**QTSGRLNASLDKSSGR
STLYIAASQPGDSATYL**CAVRPQQGAQKLVF**GQGTRLTINPNiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfds
qtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivl
rilllkvagfnllmtlrlwss

* En la Tabla 2 se proveen, en parte secuencias de TCR representativas agrupadas de acuerdo con la presentación del serotipo de MHC y subagrupadas de acuerdo con los diferentes péptidos presentados por el serotipo de MHC y a las que se unen los TCR de los subgrupos. Se describen y reivindican los TCR individuales, como aquellos que se dan como ejemplo de manera representativa en las tablas, así como el género de proteínas de unión que se unen a una secuencia de epítopos peptídicos según se describe en la presente, ya sea solos o en un complejo con un MHC, como los agrupados en las tablas que se proveen aquí. Además, se proveen genes TRAV, TRAJ y TRAC para cada cadena alfa de TCR según se describe en la presente, y genes TRBV, TRBJ y TRBC para cada cadena beta de TCR según se describe en la presente. Las secuencias para cada TCR que se describen en la presente se proveen como pares de cadena alfa y cadena betas afines para cada TCR nominado. Las secuencias de TCR que se describen en la presente tienen anotaciones. Las secuencias de dominios variables están en mayúscula. Las secuencias de dominio constante están en minúsculas. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 se indican usando texto en negrita y subrayado. CDR1, CDR2 y CDR3 se muestran en el orden estándar de aparición de izquierda (extremo N) a derecha (extremo C). Los genes TRAV, TRAJ y TRAC para cada cadena alfa de TCR según se describe en la presente, y los genes TRBV, TRBJ y TRBC para cada cadena beta de TCR según se describe en la presente, se indican de acuerdo con la nomenclatura IMGT bien conocida según se describe en la presente. De manera similar, las CDR1 y CDR2 de TRAV y TRBV son bien conocidas en el arte ya que se basan en secuencias de TRAV y TRBV bien conocidas y anotadas (por ejemplo, como figuran en bases de datos tales como IMGT, que se puede ver en imt.org e IEDB que se puede ver en iedb.org).

Tabla 3

Secuencia representativa de ADNc del MAGEA1 humano

atgtctcttgagcagaggagtctgcactgcaagcctgaggaagcccttgaggcccaacaagaggccctgggcctggtgtgtgtgca
ggctgccacctcctcctcctctcctctggtcctgggcaccctggaggaggtgcccactgctgggtcaacagatcctccccagagtcct
cagggagcctccgcctttcccactaccatcaacttcactcgacagaggcaacccagtgagggttccagcagccgtgaagaggag
gggccaagcacctcttgtatcctggagtccttgttccgagcagtaatcactaagaaggtggctgatttggttggttttctgctcctcaaata
tcgagccagggagccagtcacaaaggcagaaatgctggagagtgtcatcaaaaattacaagcactgttttcctgagatcttcggca
aagcctctgagtccttgcagctggtctttggcattgacgtgaag**gaagcagaccccaccggccactcctat**gtccttgtcacctgc
ctaggtctctcctatgatggcctgctgggtgataatcagatcatgcccaagacaggcttcctgataattgtcctggtcatgattgcaatgg

agggcggccatgctcctgaggaggaaatctgggaggagctgagtgtgatggaggtgtatgatgggagggagcacagtgcctatg
gggagcccaggaagctgctcacccaagatttggtgcaggaaaagtacctggagtaccggcaggtgccggacagtgatcccgca
cgctatgagttcctgtggggtccaagggccctcgctgaaaccagctatgtgaaagtccttgagtatgtgatcaaggtcagtgcaaga
gttcgctttttcttcccatccctgcgtgaagcagctttgagagaggaggaagagggagtctga

Secuencia proteica representativa del MAGEA1 humano

MSLEQRSLHCKPEEALEAQQEALGLVCVQAATSSSSPLVLGTLEEVPTAGSTDPPQSPQGAS
AFPTTINFTRQRQPSEGSSSREEEGPSTSCILESLFRAVITKKVADLVGFLLLKYRAREPVTKA
EMLESVIKNYKHCFPEIFGKASESLQLVFGIDVK**EADPTGHSY**VLVTCLGLSYDGLLGDNQIMP
KTGFLIIVLVMIAMEGGHAPEEEIWEELSVMEVYDGREHSAYGEPRKLLTQDLVQEKYLEYRQ
VPDSDPARYEFLWGPRALAETSYVKVLEYVIKVSARVRFFFPSLREAALREEEEGV*

Secuencia representativa de ADN del HLA-A*01:01 humano

ATGGCCGTCATGGCGCCCCGAACCCTCCTCCTGCTACTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGAC
CCAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCCCGGCCCG
GCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCG
GTTCGACAGCGACGCCGCGAGCCAGAAGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAG
GAGGGGCCGGAGTATTGGGACCAGGAGACACGGAATATGAAGGCCCACTCACAGACTG
ACCGAGCGAACCTGGGGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGACGGTTCTCA
CACCATCCAGATAATGTATGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCTTCCTCCGCGGG
TACCGGCAGGACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTC
TTGGACCGCGGCGGACATGGCAGCTCAGATCACCAAGCGCAAGTGGGAGGCGGTCCAT
GCGGCGGAGCAGCGGAGAGTCTACCTGGAGGGCCGGTGCGTGGACGGGCTCCGCAGA
TACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACCCCCCCAAGACACATATGA
CCCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTAC
CCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACACGG
AGCTCGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGGCTGTGGT
GGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTCTGCCCA
AGCCCCTCACCCTGAGATGGGAGCTGTCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGCATC
ATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAGCTGTGATCACTGGAGCTGTGGTCGCTGCCGTGAT
GTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGGAGTTACACTCAGGCTGCAAGCAGTG
ACAGTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACAGCTTGTAAAGTGTGA

Secuencia proteica representativa del HLA-A*01:01 humano

MAVMAPRTLLLLLSGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQKMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNMKAHSQTDRANLGTLRGYYNQSEDGSHTIQIMY
GCDVGPDGRFLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAVHAAEQRRVYL
EGRCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGE
DQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWELSSQPTIPI
VGIIAGLVLLGAVITGAVVAAVMWRRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQGSDVSLTACKV

Vector representativo (cuya proteína TCR codificada se puede intercambiar por cualquier secuencia de TCR de interés)*:* pTSLV102-MSCV-HA1-10-30-MGTM-Q-CD8

tggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcaga
actacacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaa
gaggccaataaaggagagaacaccagcttgttacaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagag
tggaggtttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgct
acaagggactttccgctggggactttccagggaggcgtggcctgggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatata
agcagctgctttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgctta
agcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttag
tcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcagg
actcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggcta
gaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccag
ggggaaagaaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttaga
aacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataata
cagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaa
aacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggag
aagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagag
agaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacg
ctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctg
ttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctgg
ggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaa
tcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccag
caagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatat
aaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattc
accattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggagagaga

gacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattaattcacaaatggcagtattcatccacaatttta
aaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaactaaagaatt
acaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacaggCGcGCcagagatccagtttggacCTgcAGG**TGAAA**
GACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGtTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAA
AATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGA
ATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGA
ACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTT
TCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGT
TtGCTTCTtGCTTCTGTTtGtGtGCTTCTGCTCCCtGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCC
CTCACTtGGtGgGCCAGTCCTCtGATAGACTGtGTCcCCtGGaTACCCGTAcggtaccgctagcgcc
acc***ATGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGGCCCTGTGTCTCCTGGGGGCAGATCACGC***
AGATACTGGAGTCTCCCAGGACCCCAGACACAAGATCACAAAGAGGGGACAGAATGTT
ACTTTCAGGTGTGATCCAATTTCTGAACACAACCGCCTTTATTGGTACCGCCAGACCCT
GGGGCAGGGCCCAGAGTTTCTGACTTACTTCCAGAATGAAGCTCAACTTGAAAAATCAA
GGCTGCTCAGTGATCGGTTCTCTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCTTTCTCCACCTTGGAG
ATCCAGCGCACAGAGCAGGGGGACTCTGCCATGTATCTCTGTGCCAGCAGCCGCACTG
CTGGAGATACTCAGTATTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAAGATCTGAA
CAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTTCTaAGGCCGAGATCgccCACA
CaCAaAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCACGTGGAACTG
TCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACTCCGGCGTGtcAACgGATCCCCAGCCTCT
GAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTG
TCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACG
GCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCG
TGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCA
GGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTAC
GCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCA
GCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCC
GGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCT**ATGGAAACCCTcTTGGGCCTGCTTATCCTTTG**
GCTGCAGCTGCAATGGGTGAGCAGCAAACAGGAGGTGACTCAGATTCCTGCAGCTCTG
AGTGTCCCAGAAGGAGAAAACTTGGTTCTCAACTGCAGTTTCACTGATAGCGCTATTTA
CAACCTCCAGTGGTTTAGGCAGGACCCTGGGAAAGGCCTCACATCTCTGTTGCTTATTC

AGTCAAGTCAGAGAGAGCAAACAAGTGGACGCCTTAATGCCTCTCTGGATAAATCATCA
GGACGCAGTACTCTTTACATTGCAGCTTCTCAGCCTGGTGATTCAGCCACCTACCTGTG
CGCTGTGAGGGGTGGTACCTCAGGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCACCAGG
CTGAAGGTTCTTGCAAACATCCAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGGGACT
CCAAGTCCAGCGACAAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGT
GAGTCAAAGCAAGGACAGCGACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGG
AGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCT
GCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGA
CGTGCCCTGCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAAC
TTTCAGAACCTGCTGGTGATCGTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAA
TCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCC
ACCAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCCCATGGC
GCTGCCCGTCACCGCGCTGCTGCTGCCCCTGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCA
GAGCTTCCCACCCAGGGCACATTCTCCAACGTGTCCACCAATGTGTCGGGAGGCGGCGG
ATCGTCCCAGTTCAGAGTGTCCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGG
AGCTGAAATGTCAGGTCCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGCAGTTGGCTGTTCCAG
CCGCGTGGTGCTGCCGCAAGCCCTACGTTCCTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAA
GGCGGCCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATTCTCCGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTC
GTGCTTACTTTGAGCGATTTCCGCAGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGTTCGGCGCTG
AGCAATTCCATCATGTATTTCAGCCACTTTGTGCCAGTGTTCCTGCCTGCCAAGCCTACCA
CAACACCAGCTCCCCGTCCCCCGACTCCGGCGCCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGAGC
CTGAGGCCTGAGGCTTGTCGGCCCGCTGCGGGGGGTGCCGTCCACACCAGGGGCCTCG
ACTTTGCGTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCTGCGGGGTGCTGCTG
CTGTCATTGGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGGGTCTGTAAGTGC
*CCACGGCCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTG*CGCGC
TAAGCGCAGCGGTTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATGTGG
AGGAGAATCCAGGGCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCTCACT
GTCTTGCATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACGAA
CAAGATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGG
CTACGACAGCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCTTTGGG
ATTCTGCTAAAGGCACCATCCATGGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTTC

CGCGACGCATCCCGCTTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCAT
CTACTTCTGTATGATCGTTGGCTCCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTC
CGTGGTGGACTTCCTGCCCACCACAGCCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCTCAAGAAGC
GCGTGTGCCGACTGCCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGCCCTCTGTGCTCCCCCATCACC
CTTGGACTGCTGGTGGCGGGAGTCCTGGTGCTGCTCGTATCTCTGGGTGTCGCCATCCA
CCTGTGCTGCCGCCGCCGCCGCGCCCGCCTGAGGTTTATGAAACAGTTTTACAAGTGAT
AAatcgatagatcctaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtgga
tacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggag
ttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtca
gctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcg
gctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcg
ggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtct
tcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcctgagatcctttaagaccaatgacttacaaggcagctgt
agatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatctgcttttgcttgtactg
ggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttga
gtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcag
tagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggcccgggttaattaaggaaag
ggctagatcattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggt
ggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctg
ataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcct
gtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctca
acagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatc
ccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaa
agcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgac
aacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagct
gaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcga
actacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccg
gctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctc
ccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactga
ttaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagat
cctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttct

tgagatccttttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagcta
ccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttc
aagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgg
gttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcg
aacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacagg
tatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcg
ggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctt
tttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatccCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA
GTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGC
CGATTCATTAATGCAGCAAGCTCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAG
GCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGG
CTTTTGCAAAAAGCTCCCCGTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAG
CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGC
TTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCT
ATGACATGATTACGAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAA
ATCATCCCAAACTTCCCACCCCATACCCTATTACCACTGCCAATTACCTGTGGTTTCATTTA
CTCTAAACCTGTGATTCCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATTGTATTTGTTAAATATGT
ACTACAAACTtagtagt

Vector representativo (cuya proteína TCR codificada se puede intercambiar por cualquier secuencia de TCR de interés)*: pHAGE-MSCV-HN-P32-41-P2A-dnTGFbRII (con dnTGFbRII resaltado en negrita)

tggaagggctaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcaga
actacacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaa
gaggccaataaaggagagaacaccagcttgttacaccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagag
tggaggtttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgct
acaagggactttccgctggggactttccagggaggcgtggcctgggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatata
agcagctgctttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgctta
agcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttag
tcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcagg

actcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggcta
gaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccag
ggggaaagaaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttaga
aacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataata
cagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaa
aacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggag
aagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagag
agaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacg
ctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctg
ttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctgg
ggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaa
tcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccag
caagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatat
aaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattc
accattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggagagaga
gacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgccgaattaattcacaaatggcagtattcatccacaatttta
aaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaactaaagaatt
acaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacaggCGcGCcagagatccagtttggacCTgcAGGTGAAA
GACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGtTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAA
TACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATAT
GGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGA
TGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTTCCAGG
GTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTtGCTTCTt
GCTTCTGTTtGtGtGCTTCTGCTCCCtGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTtGGt
GgGCCAGTCCTCtGATAGACTGtGTCcCCtGGaTACCCGTAcggtaccgctagcgccaccATGGGCT
CCTGGACCCTCTGCTGTGTGTCCCTTTGCATCCTGGTTGCAAAGCACACAGATGCTGGAG
TTATCCAGTCACCCCGGCACGAGGTGACAGAGATGGGACAAGAAGTGACTCTGAGATGT
AAACCAATTTCAGGACATGACTACCTTTTCTGGTACAGACAGACCATGATGCGGGGACTG
GAGTTGCTCATTTACTTTAACAACAACGTTCCTATTGATGATTCAGGGATGCCCGAGGATC
GCTTCTCAGCTAAGATGCCTAATGCATCATTCTCCACTCTGAAGATCCAGCCCTCAGAAC
CCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTTTCTCGGCTGGAATGAAAAACTGT

TCTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCTCTGTCTTGGAAGATCTGAACAAGGTGTTCCCTCCAG
AGGTGGCCGTGTTCGAGCCTTCTaAGGCCGAGATCgccCACACaCAaAAAGCCACCCTCGT
GTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCA
AAGAGGTGCACTCCGGCGTGtcAACgGATCCCCAGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGA
ACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAAC
CCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTG
GACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGA
GCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCT
GTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGC
TGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAG
CGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGAC
CTATGGTCCTGAAATTCTCCGTGTCCATTCTTTGGATTCAGTTGGCATGGGTGAGCACCC
AGCTGCTGGAGCAGAGCCCTCAGTTTCTTAGCATCCAAGAGGGAGAAAATCTCACTGTGT
ACTGCAACTCCTCAAGTGTTTTCTCCAGCCTTCAATGGTACAGACAGGAGCCTGGGGAAG
GTCCTGTCCTCCTGGTGACAGTTGTTACTGGTGGAGAAGTGAAGAAGCTGAAGAGACTTA
CCTTTCAGTTTGGTGATGCAAGAAAGGACAGTTCTCTCCACATCACTGCAGCCCAGCCTG
GTGATACAGGCCTCTACCTCTGTGCAGGAGATGAAAGTATTAGCTATGGAAAGCTGACAT
TTGGACAAGGGACCATCTTGACTGTCCATCCAAacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagg
gactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgac
gtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagc
gacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaa
actggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgCTGAAA
GTGGCCGGCTTCAATCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTC
CGGCAGCGGAGCCACCAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACC
CTGGCCCC**ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTG**
GACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATG
ATAGTCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACTGTGTAAATTTTGTGATGT
GAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCA
TCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACAT
AACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAG
ATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTC

ATGTGTTCCTGTAGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAAC
ACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCC
ACCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTaaccggcagc
agaagTAGTGATAAatcgatagatcctaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgct
cctttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttg
ctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggc
attgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgct
gctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgc
cacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctct
gcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcctgagatcctttaagaccaatg
acttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaag
atctgcttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcct
caataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagt
gtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggcc
cgggttaattaaggaaagggctagatcattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataa
tggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgct
catgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttt
tttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggtt
acatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgc
tatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtac
tcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgc
ggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgat
cgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcg
caaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccactt
ctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggg
gccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctg
agataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaa
aaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtaga
aaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgt
ttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagcc
gtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcg

ataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcaca
cagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagg
gagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcct
ggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaa
cgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatccCCTGATTCTGTG
GATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGA
GCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC
CCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCAAGCTCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT
TTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCCGTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAA
AGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGG
CTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA
CACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATT
CTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAACTGGATAACT
CAAGCTAACCAAAATCATCCCAAACTTCCCACCCCATACCCTATTACCACTGCCAATTACC
TGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATTGTA
TTTGTTAAATATGTACTACAAACTtagtagt

Vector representativo (cuya proteína TCR codificada se puede intercambiar por cualquier secuencia de TCR de interés)*:* pNVVD136_TSC-204-A02_TCR-1479_MSCV-TCR-1479-CD8- EF1α-dnTGFbRII-DHFR

GCTAGCTGGCTTGTTGTCCACAACCATTAAACCTTAAAAGCTTTAAAAGCCTTATATATTCT
TTTTTTTCTTATAAAACTTAAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGATTTATATTAATTTTAT
TGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACATTAGCCATGAGAG
CTTAGTACATTAGCCATGAGGGTTTAGTTCATTAAACATGAGAGCTTAGTACATTAAACAT
GAGAGCTTAGTACATACTATCAACAGGTTGAACTGCTGATCTGTACAGTAGAATTGGTAAA
GAGAGTTGTGTAAAATATTGAGTTCGCACATCTTGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAA
CCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTA
GGTACCAATTACATTGCTTGCAATTAACCCTTTAACGGTTATAAGGATCTAGATGAGATAG
AAAGATTTGGTTTTCGGATTTGTGTTACATAAGATGCCTAAAATAAAAATTGAGATTCAATT
TTTTTTAAACTTTTTTTTTAATTGGTGGTAAGAATATTCCCTCTACCTGTTTGAGAGTAATGAA
ATTGTAGTATGATTTTTCAACAAACTAAAAAAACAACATAAATCTCACATAATAACTTTATTT

CAATCACACAATTGAATACCAATAGGTTGACAGTACTTACCAGCCTGCAGG**TGAAAGACC**
CCACCTGTAGGTTTGGCAAGTTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATA
CATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATAT
GGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG
ATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTTCCA
GGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTTGCT
TCTTGCTTCTGTTTGTGTGCTTCTGCTCCCTGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCA
CTTGGTGGGCCAGTCCTCTGATAGACTGTGTCCCCTGGATACCCGTACGGTACCGCTAG
CGCCACC***ATGGGACCCAGGCTCCTCTTCTGGGCACTGCTTTGTCTCCTCGGAACAGGCC***
CAGTGGAGGCTGGAGTCACACAAAGTCCCACACACCTGATCAAAACGAGAGGACAGC
AAGCGACTCTGAGATGCTCTCCTATCTCTGGGCACACCAGTGTGTACTGGTACCAACAG
GCCCTGGGTCTGGGCCTCCAGTTCCTCCTTTGGTATGACGAGGGTGAAGAGAGAAACA
GAGGAAACTTCCCTCCTAGATTTTCAGGTCGCCAGTTCCCTAATTATAGCTCTGAGCTGA
ATGTGAACGCCTTGGAGCTGGAGGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCTTCCTCACTTGGG
CAATTGAACACAGAGGCATTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCACAGTTGTAGAAGATCT
GAACAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTTCTAAGGCCGAGATCGCC
CACACACAAAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCACGTGG
AACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACTCCGGCGTGTCAACGGATCCCCA
GCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACTG
AGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGT
TTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACAC
AAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCTA
TCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCACC
CTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACTT
TGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAAC
AAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCT**ATGGAAAAAATGCTCGAGTGCGCCTT**
CATCGTGCTTTGGCTGCAGCTCGGATGGCTGAGCGGAGAGGATCAAGTGACACAGTCT
CCCGAGGCTCTGAGGCTGCAAGAGGGCGAAAGCAGCTCCCTGAATTGCAGCTACACCG
TGTCTGGCCTGAGGGGCCTGTTTTGGTACAGACAAGACCCTGGCAAGGGACCCGAGTT
CCTGTTCACACTGTACTCTGCCGGCGAAGAAAAAGAGAAAGAGCGCCTGAAAGCAACC
CTGACCAAGAAAGAGAGCTTCCTGCACATCACAGCCCCTAAGCCAGAGGACAGCGCTA

CTTACCTGTGTGCCGTTTCATACGGCCAGAATTTCGTTTTTGGTCCCGGAACCAGATTGT
CCGTGCTGCCCTACATCCAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGGGACTCCAA
GTCCAGCGACAAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGAGT
CAAAGCAAGGACAGCGACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGC
ATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCG
CCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGACGT
GCCCTGCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACTTT
CAGAACCTGCTGGTGATCGTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAATCT
GCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCAC
CAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCCC*ATGGCGC*
TGCCCGTCACCGCGCTGCTGCTGCCCCTGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCA<u>*GA*</u>
<u>*GCTTCCCACCCAGGGCACATTCTCCAACGTGTCCACCAATGTGTCG*</u>*GGAGGCGGCGGAT*
CGTCCCAGTTCAGAGTGTCCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGGA
GCTGAAATGTCAGGTCCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGCAGTTGGCTGTTCCAGC
CGCGTGGTGCTGCCGCAAGCCCTACGTTCCTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAG
GCGGCCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATTCTCCGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTCG
*TGCTTACT*TTGAGCGATTTCCGCAGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGTTCGGCGCTGA
GCAATTCCATCATGTATTTCAGCCACTTTGTGCCAGTGTTCCTGCCTGCCAAGCCTACCAC
AACACCAGCTCCCCGTCCCCCGACTCCGGCGCCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGAGCC
TGAGGCCTGAGGCTTGTCGGCCCGCTGCGGGGGGTGCCGTCCACACCAGGGGCCTCGA
CTTTGCGTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCTGCGGGGTGCTGCTGC
TGTCATTGGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGGGTCTGTAAGTGCC
CACGGCCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTGCGCGCT
AAGCGCAGCGGTTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATGTGGA
GGAGAATCCAGGGCCC<u>ATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCTCACTG</u>
<u>TCTTGCATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACGAACA</u>
<u>AGATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGGCT</u>
<u>ACGACAGCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCTTTGGGATT</u>
<u>CTGCTAAAGGCACCATCCATGGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTTCCGC</u>
<u>GACGCATCCCGCTTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCATCTA</u>
<u>CTTCTGTATGATCGTTGGCTCCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTCCGT</u>

GGTGGACTTCCTGCCCACCACAGCCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCTCAAGAAGCGCG
TGTGCCGACTGCCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGCCCTCTGTGCTCCCCCATCACCCTT
GGACTGCTGGTGGCGGGAGTCCTGGTGCTGCTCGTATCTCTGGGTGTCGCCATCCACCT
GTGCTGCCGCCGCCGCCGCGCCCGCCTGAGGTTTATGAAACAGTTTTACAAGTGATAAAT
CGATGGAAGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTT
GCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACT
AGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTT
GGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGG
CACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGC
CTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTG
GTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGAT
CTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCC
TGTCCTTCTGATTACTAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA
CAGTCCCCGAGAAGTTGTGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTG
GCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG
GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTG
CCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGT
TATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCC
GAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTC
GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGG
TGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGAT
GACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGC
ACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG
CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTA
GTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCG
CCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC
TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTG
ACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGT
ACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT

TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTC
CATTTCAGGTGTCGTGAACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGATATCACGGCTAGCG
CCACCATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGAC
GCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTCAGAAGTCGGTGAATAACGACATGATAG
TCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATT
TTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGA
GAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGA
GACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCT
CCAAAGTGCATTATGAAGGAGAAGAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCTGTA
GCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGA
CTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGC
CATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTGAACCGGCAGCAGAAGGCTAGTGG
TTCAGGCGCAACGAATTTCTCTTTGCTGAAGCAGGCTGGGGATGTCGAAGAAAATCCGG
GTCCAATGGTGGGCTCGCTCAACTGCATCGTAGCAGTCTCCCAGAATATGGGCATCGGG
AAGAACGGTGATTTCCCGTGGCCCCCACTTCGCAACGAGAGCCGTTATTTCCAAAGAATG
ACTACAACCTCCTCCGTGGAGGGTAAGCAGAACCTGGTCATCATGGGGAAGAAGACCTG
GTTCTCTATCCCTGAAAAAAACCGCCCCCTGAAGGGCCGCATCAACCTGGTGCTGAGCA
GGGAACTCAAGGAGCCTCCTCAGGGCGCGCATTTTCTGAGCCGCTCATTGGATGACGCT
CTCAAACTGACCGAACAGCCGGAGCTAGCCAACAAGGTGGACATGGTGTGGATCGTCGG
AGGCTCCTCCGTGTACAAGGAGGCCATGAATCACCCCGGCCACTTGAAGCTGTTCGTCA
CCCGGATCATGCAGGACTTCGAGTCGGACACGTTCTTTCCAGAGATTGACCTGGAGAAGT
ACAAGCTGCTGCCCGAGTACCCGGGAGTTCTTAGTGATGTGCAGGAGGAGAAAGGCATC
AAGTACAAATTTGAGGTGTACGAGAAGAACGACTAACGGTCCGTCCTGACCAATGCTGGA
GTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC
ATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACT
CATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACAGGTTACCTCAGTCTCCTAGGTACGTCTTATAT
CTATGAAAAAACATTCAAAAGCACAACATCTAGAAGAACTTACCTTTTTTCACCACTCTATT
GCAAAGATATGTACCGATTTCTCTCGAAGTACAAAAAACCGCTAGTTTTCAAATTCACCTC
AAGACTTTGAAAAAAAATTGAATCTGTCAATGTCAAATAAAATCAGAAACAAATGTCATAAT
GTTACGTTAATGTTGTCAGGTCGAAAAATAAAATTGCAAATAGAAATTTTGTTCCTTTTTTAT

TGGTTTTTATTGGTGGGAAAAATATTCCCTCTAACTGCAAAAGGGTTAATTATGTTAGAGG
TAGAGTCGACAAGCTT

Vector representativo (cuya proteína TCR codificada se puede intercambiar por cualquier secuencia de TCR de interés):pNVVD166pNVVD236_TSC-204-A01_TCR-458_MSCV-TCR-458-CD8-EF1a-dnTGFbRII-DHFR

GCTAGCTGGCTTGTTGTCCACAACCATTAAACCTTAAAAGCTTTAAAAGCCTTATATATTCT
TTTTTTTCTTATAAAACTTAAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGATTTATATTAATTTTAT
TGTTCAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACATTAGCCATGAGAG
CTTAGTACATTAGCCATGAGGGTTTAGTTCATTAAACATGAGAGCTTAGTACATTAAACAT
GAGAGCTTAGTACATACTATCAACAGGTTGAACTGCTGATCTGTACAGTAGAATTGGTAAA
GAGAGTTGTGTAAAATATTGAGTTCGCACATCTTGTTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAAA
CCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTA
GGTACCAATTACATTGCTTGCAATTAACCCTTTAACGGTTATAAGGATCTAGATGAGATAG
AAAGATTTGGTTTTCGGATTTGTGTTACATAAGATGCCTAAAATAAAAATTGAGATTCAATT
TTTTTTAAACTTTTTTTTAATTGGTGGTAAGAATATTCCCTCTACCTGTTTGAGAGTAATGAA
ATTGTAGTATGATTTTTCAACAAACTAAAAAAACAACATAAATCTCACATAATAACTTTATTT
CAATCACACAATTGAATACCAATAGGTTGACAGTACTTACCAGCCTGCAGG**TGAAAGACC**
CCACCTGTAGGTTTGGCAAGTTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATA
CATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATAT
GGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG
ATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGCGAACCATCAGATGTTTCCA
GGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTTGC
TTCTTGCTTCTGTTTGTGTGCTTCTGCTCCCTGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCT
CACTTGGTGGGCCAGTCCTCTGATAGACTGTGTCCCCTGGATACCCGTACGGTACCGCT
AGCGCCACC***ATGGGACCCGGCCTTCTGTGTTGGGCCCTGCTTTGCCTTCTCGGAGCTGG***
CTCTGTGGAAACCGGCGTGACACAGTCTCCTACACATCTGATCAAAACTCGCGGGCAA
CAAGTGACTCTGCGGTGTAGCTCTCAGTCCGGCCACAACACAGTTTCTTGGTATCAGCA
AGCTCTCGGCCAGGGGCCACAGTTTATTTTCCAGTACTACCGCGAGGAAGAGAACGGC
AGAGGCAACTTTCCACCTCGGTTTTCCGGACTGCAGTTTCCCAACTACTCCTCCGAGCT
GAACGTGAACGCCTTGGAGCTGGATGATAGTGCCCTCTACCTCTGCGCTTCCAGCACA
GACATCACCTATGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAAGATC

TGAACAAGGTGTTCCCTCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTTCTAAGGCCGAGATCGC
CCACACACAAAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTTCCCCGACCACGTG
GAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACTCCGGCGTGTCAACGGATCCCC
AGCCTCTGAAAGAACAGCCTGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCTCCAGACT
GAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAG
TTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACA
CAAATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGAAGAGCCGATTGCGGCATCACCAGCGCCTCCT
ATCACCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTGTACGAAATCCTGCTGGGCAAGGCCAC
CCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCTCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGAC
TTTGGCAGCGGCAGAGCCAAAAGGTCCGGGAGCGGTGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAA
ACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCT**ATGGAAACCCTGCTGGGACTGCTG**
ATCCTGTGGCTGCAGCTTCAGTGGGTGTCCTCTAAGCAAGAAGTGACACAGATCCCTGC
CGCACTGTCTGTGCCTGAGGGCGAAAACCTGGTGCTGAACTGCTCCTTCACCGACTCC
GCCATCTACAACCTGCAGTGGTTCAGACAGGACCCCGGCAAGGGACTGACAAGCCTGC
TGCTCATTCAGAGCAGCCAGAGAGAGCAGACCAGCGGCAGACTGAATGCCAGCCTGG
ATAAGTCCTCCGGCAGAAGCACCCTGTATATCGCCGCTTCTCAGCCAGGCGATAGCGC
CACATACCTGTGCGCTGTGCAATATGGGAATAAACTCGTTTTCGGCGCAGGAACCATTC
TGAGAGTCAAGTCCTACATCCAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGGGACTC
CAAGTCCAGCGACAAGAGCGTGTGTCTGTTTACGGACTTCGACAGCCAGACCAACGTG
AGTCAAAGCAAGGACAGCGACGTCTACATAACGGATAAGACCGTGCTGGACATGCGGA
GCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTG
CGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGACACCTTCTTCCCCAGCAGCGAC
GTGCCCTGCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGTCCTTCGAGACAGACACCAATCTGAACT
TTCAGAACCTGCTGGTGATCGTGCTGCGGATTCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAAT
CTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCAGGGCTAAGAGGTCCGGCAGCGGAGCCA
CCAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCTGGTGACGTGGAAGAAAACCCTGGCCCC*ATGGCG*
CTGCCCGTCACCGCGCTGCTGCTGCCCCTGGCGCTGCTGTTACACGCCGCTCGGCCA<u>*G*</u>
<u>*AGCTTCCCACCCAGGGCACATTCTCCAACGTGTCCACCAATGTGTCG*</u>*GGAGGCGGCGGA*
TCGTCCCAGTTCAGAGTGTCCCCTCTGGACCGCACCTGGAACCTGGGCGAGACCGTGGA
GCTGAAATGTCAGGTCCTGCTGAGCAACCCGACCTCCGGGTGCAGTTGGCTGTTCCAGC
CGCGTGGTGCTGCCGCAAGCCCTACGTTCCTGCTTTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAG

GCGGCCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATTCTCCGGCAAGCGCCTGGGGGACACATTCG
TGCTTACTTTGAGCGATTTCCGCAGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGTTCGGCGCTGA
GCAATTCCATCATGTATTTCAGCCACTTTGTGCCAGTGTTCCTGCCTGCCAAGCCTACCAC
AACACCAGCTCCCCGTCCCCCGACTCCGGCGCCTACCATCGCGAGTCAACCGTTGAGCC
TGAGGCCTGAGGCTTGTCGGCCCGCTGCGGGGGGTGCCGTCCACACCAGGGGCCTCGA
CTTTGCGTGCGACATCTATATTTGGGCGCCTCTGGCGGGTACCTGCGGGGTGCTGCTGC
TGTCATTGGTGATTACCCTGTACTGCAATCACCGCAACCGCCGGCGGGTCTGTAAGTGCC
*CACGGCCTGTGGTCAAGTCCGGTGACAAACCGTCGCTCTCGGCTCGCTACGTG*GCGCGCT
AAGCGCAGCGGTTCCGGGGCCACCAACTTTTCATTGCTGAAGCAGGCCGGTGATGTGGA
GGAGAATCCAGGGCCCATGCGCCCCAGGCTTTGGCTCCTTCTTGCTGCTCAGCTCACTG
TCTTGCATGGCAACTCCGTTCTGCAGCAGACTCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACGAACA
AGATGGTGATGCTGTCATGCGAGGCCAAGATCTCTCTTTCAAATATGAGAATTTATTGGCT
ACGACAGCGCCAGGCCCCCTCCAGCGACAGCCACCACGAGTTCCTGGCGCTTTGGGATT
CTGCTAAAGGCACCATCCATGGAGAGGAGGTGGAACAGGAGAAGATAGCTGTCTTCCGC
GACGCATCCCGCTTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCGGAGGACAGCGGCATCTA
CTTCTGTATGATCGTTGGCTCCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAAGGCACCCAGCTGTCCGT
GGTGGACTTCCTGCCCACCACAGCCCAGCCAACCAAGAAATCCACCCTCAAGAAGCGCG
TGTGCCGACTGCCCCGCCCTGAAACCCAGAAGGGCCCTCTGTGCTCCCCCATCACCCTT
GGACTGCTGGTGGCGGGAGTCCTGGTGCTGCTCGTATCTCTGGGTGTCGCCATCCACCT
GTGCTGCCGCCGCCGCCGCGCCCGCCTGAGGTTTATGAAACAGTTTTACAAGTGATAAAT
CGATGGAAGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTT
GCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACT
AGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTT
GGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGG
CACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGC
CTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTG
GTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCTCAGGTGAT
CTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCC
TGTCCTTCTGATTACTAGTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCA
CAGTCCCCGAGAAGTTGTGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTG
GCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTG

GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTG
CCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGT
TATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCC
GAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTC
GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGG
TGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGAT
GACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGC
ACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG
CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTA
GTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCG
CCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC
TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTG
ACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGT
ACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG
GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT
TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTC
CATTTCAGGTGTCGTGAACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGATATCACGGCTAGCG
CCACCATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGAC
GCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACGTTCAGAAGTCGGTGAATAACGACATGATAG
TCACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATT
TTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGA
GAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACACTAGA
GACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCT
CCAAAGTGCATTATGAAGGAGAAGAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCTGTA
GCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGA
CTTGTTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGC
CATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTGAACCGGCAGCAGAAGGCTAGTGG
TTCAGGCGCAACGAATTTCTCTTTGCTGAAGCAGGCTGGGGATGTCGAAGAAAATCCGG
GTCCAATGGTGGGCTCGCTCAACTGCATCGTAGCAGTCTCCCAGAATATGGGCATCGGG
AAGAACGGTGATTTCCCGTGGCCCCCACTTCGCAACGAGAGCCGTTATTTCCAAAGAATG

ACTACAACCTCCTCCGTGGAGGGTAAGCAGAACCTGGTCATCATGGGGAAGAAGACCTG
GTTCTCTATCCCTGAAAAAAACCGCCCCCTGAAGGGCCGCATCAACCTGGTGCTGAGCA
GGGAACTCAAGGAGCCTCCTCAGGGCGCGCATTTTCTGAGCCGCTCATTGGATGACGCT
CTCAAACTGACCGAACAGCCGGAGCTAGCCAACAAGGTGGACATGGTGTGGATCGTCGG
AGGCTCCTCCGTGTACAAGGAGGCCATGAATCACCCCGGCCACTTGAAGCTGTTCGTCA
CCCGGATCATGCAGGACTTCGAGTCGGACACGTTCTTTCCAGAGATTGACCTGGAGAAGT
ACAAGCTGCTGCCCGAGTACCCGGGAGTTCTTAGTGATGTGCAGGAGGAGAAAGGCATC
AAGTACAAATTTGAGGTGTACGAGAAGAACGACTAACGGTCCGTCCTGACCAATGCTGGA
GTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC
ATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACT
CATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACAGGTTACCTCAGTCTCCTAGGTACGTCTTATAT
CTATGAAAAAACATTCAAAAGCACAACATCTAGAAGAACTTACCTTTTTTCACCACTCTATT
GCAAAGATATGTACCGATTTCTCTCGAAGTACAAAAAACCGCTAGTTTTCAAATTCACCTC
AAGACTTTGAAAAAAAATTGAATCTGTCAATGTCAAATAAAATCAGAAACAAATGTCATAAT
GTTACGTTAATGTTGTCAGGTCGAAAAATAAAATTGCAAATAGAAATTTTGTTCCTTTTTTAT
TGGTTTTTATTGGTGGGAAAAATATTCCCTCTAACTGCAAAAGGGTTAATTATGTTAGAGG
TAGAGTCGAC

* En algunos vectores representados, el promotor MSCV está resaltado en negritas. La cadena beta está anotada usando texto resaltado en negritas y cursiva. La cadena alfa está anotada usando texto resaltado en negritas y subrayado. La marca de enriquecimiento en CD34 (marca Q) está anotada usando texto en cursiva y subrayado. CD8-alfa está en cursiva. CD8-beta está subrayado.

Tabla 4

Secuencia optimizada por codones a base de Immatics R37P1C9 TCR MGTM

Cadena alfa:

TRAC modificado con TRAV26-2/TRAJ21/MGTM

Secuencia de ADN de cadena alfa

ATGAAGCTGGTGACCAGCATCACCGTGCTGCTGAGCCTGGGCATCATGGGCGACGCCAA
GACCACCCAGCCCAACAGCATGGAGAGCAACGAGGAGGAGCCCGTGCACCTGCCCTGC
AACCACAGC**<u>ACCATCAGCGGCACCGACTAC</u>**ATCCACTGGTACAGGCAGCTGCCCAGCC
AGGGCCCCGAGTACGTGATCCAC**<u>GGCCTGACCAGCAAC</u>**GTGAACAACAGGATGGCCAG

CCTGGCCATCGCCGAGGACAGGAAGAGCAGCACCCTGATCCTGCACAGGGCCACCCTG
AGGGACGCCGCCGTGTACTAC**TGCATCCTGTTCAACTTCAACAAGTTCTACTTC**GGCAG
CGGCACCAAGCTGAACGTGAAGCCCAacatccagaaccccgaccccgccgtgtaccagctgagggactccaa
gtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacata
acggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgc
ctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccagcagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtg
gagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggct
tcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagc

Secuencia de proteínas de la cadena alfa

MKLVTSITVLLSLGIMGDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHS**TISGTDY**IHWYRQLPSQGPEY
VIH**GLTSN**VNNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYY**CILFNFNKFYF**GSGTKLNVKPNiq
npdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipedtffps
sdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivlrilllkvagfnllmtlrlws

Cadena beta:

TRBC modificado por TRBV15/TRBJ1-4/MGTM

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGGCCCCGGCCTGCTGCACTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGCACCGGCCACGGCG
ACGCCATGGTGATCCAGAACCCCAGGTACCAGGTGACCCAGTTCGGCAAGCCCGTGACC
CTGAGCTGCAGCCAGACC**CTGAACCACAACGTG**ATGTACTGGTACCAGCAGAAGAGCAG
CCAGGCCCCCAAGCTGCTGTTCCAC**TACTACGACAAGGACTTC**AACAACGAGGCCGACA
CCCCCGACAACTTCCAGAGCAGGAGGCCCAACACCAGCTTCTGCTTCCTGGACATCAGG
AGCCCCGGCCTGGGCGACGCCGCCATGTACCTG**TGCGCCACCAGCAGCGGCGAGACC**
AACGAGAAGCTGTTCTTCGGCAGCGGCACCCAGCTGAGCGTGCTGGaagatctgaacaaggtgt
tccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccgg
ctttttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaa
agaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaaccccccggaa
ccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaaa
tcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcct
gtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggacttt
ggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcggt

Secuencia de proteínas de la cadena beta

MGPGLLHWMALCLLGTGHGDAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLSCSQT**LNHNV**MYWYQQKSSQ
APKLLFH**YYDKDF**NNEADTPDNFQSRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYL**CATSSGETNEKLF**
FGSGTQLSVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgvstdpqplkeqpalndsr
yclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgvlsatilyeillgkatlyavlvs
alvlmamvkrkdfgsgrakrsgsg

Secuencia de ADN del ORF de beta y alfa completa (La región en cursiva subrayada en el sito "Furina-P2A" codifica una secuencia que permite la expresión de dos cadenas de polipéptidos en un casete único)

ATGGGCCCCGGCCTGCTGCACTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGCACCGGCCACGGCG
ACGCCATGGTGATCCAGAACCCCAGGTACCAGGTGACCCAGTTCGGCAAGCCCGTGACC
CTGAGCTGCAGCCAGACC**CTGAACCACAACGTG**ATGTACTGGTACCAGCAGAAGAGCAG
CCAGGCCCCCAAGCTGCTGTTCCAC**TACTACGACAAGGACTTC**AACAACGAGGCCGACA
CCCCCGACAACTTCCAGAGCAGGAGGCCCAACACCAGCTTCTGCTTCCTGGACATCAGG
AGCCCCGGCCTGGGCGACGCCGCCATGTACCTG**TGCGCCACCAGCAGCGGCGAGACC**
AACGAGAAGCTGTTCTTCGGCAGCGGCACCCAGCTGAGCGTGCTGGaagatctgaacaaggtgt
tccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccgagatcgcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgcctggccaccgg
ctttttccccgaccacgtggaactgtcttggtgggtcaacggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatccccagcctctgaa
agaacagcctgccctgaacgacagccggtactgcctgagctccagactgagagtgtccgccaccttctggcagaaccccccggaa
ccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcgagaacgacgagtggacccaggacagagccaagcccgtgacacaaa
tcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcggcatcaccagcgcctcctatcaccagggcgtgctgagcgccacaatcct
gtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgccgtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaagcggaaggacttt
ggcagcggc*agagccaaaaggtccgggagcggtGCGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGA*
*CGTTGAAGAGAACCCCGGACCT*ATGAAGCTGGTGACCAGCATCACCGTGCTGCTGAGCC
TGGGCATCATGGGCGACGCCAAGACCACCCAGCCCAACAGCATGGAGAGCAACGAGGA
GGAGCCCGTGCACCTGCCCTGCAACCACAGC**ACCATCAGCGGCACCGACTAC**ATCCAC
TGGTACAGGCAGCTGCCCAGCCAGGGCCCCGAGTACGTGATCCAC**GGCCTGACCAGCA**
ACGTGAACAACAGGATGGCCAGCCTGGCCATCGCCGAGGACAGGAAGAGCAGCACCCT
GATCCTGCACAGGGCCACCCTGAGGGACGCCGCCGTGTACTAC**TGCATCCTGTTCAACT**
TCAACAAGTTCTACTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGAACGTGAAGCCCAacatccagaaccccg
accccgccgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgt
gagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagc

gccgtggcctggtccaacaagagcgacttcgcctgcgccaacgccttcaacaacagcatcatccccgaggacaccttcttccccag
cagcgacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcg
tgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagc

Secuencia de proteínas ORF beta y alfa (La region en cursive subrayada en el sitio de «FurinaP2A» permite la expression de dos cadenas de polipéptidos en un casete único)

MGPGLLHWMALCLLGTGHGDAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLSCSQT**LNHNV**MYWY
QQKSSQAPKLLFH**YYDKDF**NNEADTPDNFQSRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLC
ATSSGETNEKLFFGSGTQLSVLEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngke
vhsgvstdpqplkeqpalndsryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsas
yhqgvlsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdfgsgrakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGPMKLVT
SITVLLSLGIMGDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHS**TISGTDY**IHWYRQLPSQGPEY
VIH**GLTSN**VNNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAAVYY**CILFNFNKFYF**GSGTK
LNVKPNiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavawsnksdfacana
fnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivlrilllkvagfnllmtlrlws

Secuencia optimizada por codones basada en T Knife T1367 TCR MGTM

Cadena alfa:

Secuencia de ADN de cadena alfa TRAC modificada con TRAV5/TRAJ41/MGTM

ATGAAGACCTTCGCCGGCTTCAGCTTCCTG GGCTGCAGCTGGACTGCA
TGAGCAGGGGCGAGGACGTGGAACAGAGCCTGTTTCTGAGCGTGCGCGAGGGCG
ACAGCAGCGTGATCAATTGCACCTACACCGACAGCTCCAGCACCTACCTGTACT
GGTACAAGCAGGAACCTGGCGCCGGACTGCAGCTGCTGACCTACATCTTCAGCA
ACATGGACATGAAGCAGGACCAGAGACTGACCGTGCTGCTGAACAAGAAGGAC
AAGCACCTGAGCCTGCGGATCGCCGATACCCAGACAGGCGACAGCGCCATCTAC
TTTTGCGCCGAGAGCATCGGCAGCAACAGCGGCTACGCCCTGAACTTCGGCA
AGGGCACAAGCCTGCTCGTGACCCCTCacatccagaacccegaccccgcegtgtaccagctgagggacte
caagtccagegacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgacagccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagegacgtcta
cataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttcaagagcaacagcgccgtggcctggtccaacaagagegactt
egectgegecaacgccttcaacaacagcatcatcccegaggacaccttettccecagcagegacgtgccctgcgacgtgaaact
ggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcagaacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggcc
ggcttcaat ctgctgatgaccctgcggctgtggagc

Secuencia de proteínas de cadena alfa

MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT**DSSSTY**LYWYK
QEPGAGLQLLTY**IFSNMDM**KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAESI
GSNSGYALNFGKGTSLLVTPHiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrs
mdfksnsavawsnksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivlrilllkvagfnllmtlrlws

Cadena beta:

TRBC modificado con TRBV28/TRBJ2-7/MGTM

Secuencia de ADN de cadena beta

ATGGGAATCAGACTGCTGTGCAGAGTGGCCTTCTGCTTCCTGGCCGTGGGCCTGG
TGGACGTGAAAGTGACCCAGAGCAGCAGATACCTCGTGAAGCGGACCGGCGAG
AAGGTGTTCCTGGAATGCGTGCAGGACATGGACCACGAGAATATGTTCTGGTAC
AGACAGGACCCCG GGCTGATCTACTTCAGCTACGACGTGAA
GATGAAGGAAAAGGGCGACATCCCCGAGGGCTACAGCGTGTCCAGAGAGAAGA
AAGAGCGGTTCAGCCTGATCCTGGAAAGCGCCAGCACCAACCAGACCAGCATGT
ACCTGTGCGCCAGCAGA CGGCTACGAGCAGTATTTTGGCCCTGG
CACCCGGCTGACCGTGACCGaagatctgaacaaggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggecg
agategcccacacacaaaaagccaccctcgtgtgectggccaccggctttttcccegaccacgtggaactgtcttggtgggtcaac
ggcaaagaggtgcactccggcgtgtcaacggatecccagcctctgaaagaacagectgecctgaacgacagccggtactgect
gagctecagactgagagtgtccgccaccttctggcagaaccccceggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcg
agaacgacgagtggacccaggacagagccaagecegtgacacaaatcgtgtctgccgaagcctggggaagagccgattgcgg
catcaccagegcctcctatcaccagggegtgctgagcgecacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggecaccetgtacgcc
gtgctggtgtctgctctggtgctgatggccatggtcaageggaaggactttggcagcggcagagccaaaaggtccgggagcggt

Secuencia de proteínas de cadena beta

MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQD**MDHEN**MFWYR
QDPGLGLRLIYF**SYDVKM**KEKGDIPEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYL**CASR**
GLAGYEQYFGPGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgv
stdpqplkeqpalndsryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgv
lsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdfgsgrakrsgsg

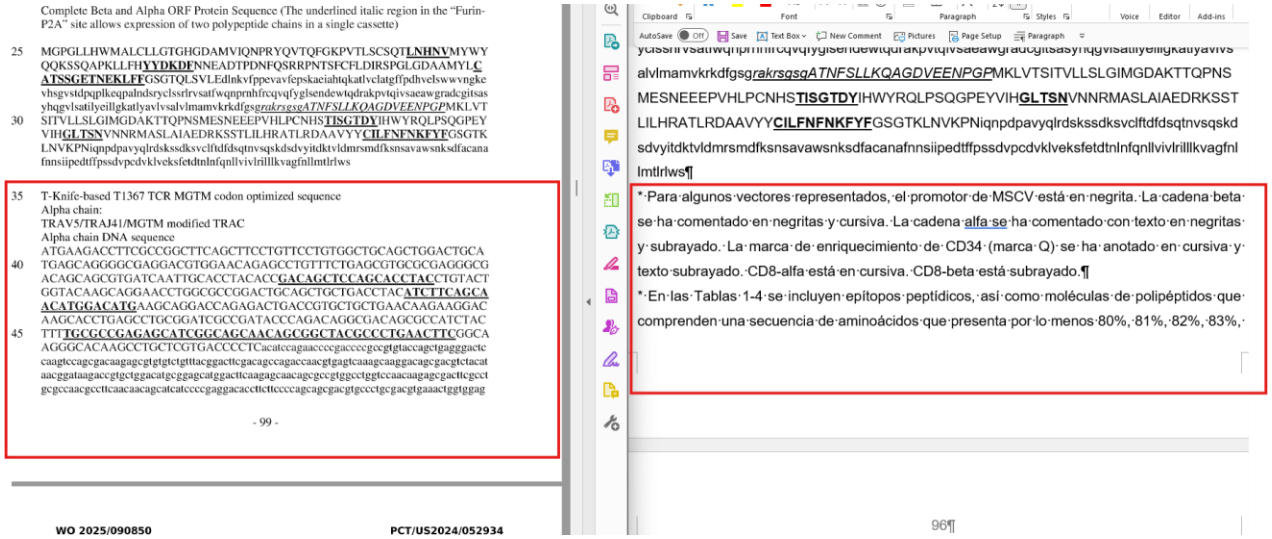
Secuencia de ADN ORF beta y alfa (La region en cursive subrayada en el sitio de «FurinaP2A» codifica una secuencia que permite la expression de dos polipéptidos en un casete único)

ATGGGAATCAGACTGCTGTGCAGAGTGGCCTTCTGCTTCCTGGCCGTGGGCCTGG
TGGACGTGAAAGTGACCCAGAGCAGCAGATACCTCGTGAAGCGGACCGGCGAG
AAGGTGTTCCTGGAATGCGTGCAGGACATGGACCACGAGAATATGTTCTGGTAC
AGACAGGACCCCGGCCTGGGCCTGCGGCTGATCTACTTCAGCTACGACGTGAA
GATGAAGGAAAAGGGCGACATCCCCGAGGGCTACAGCGTGTCCAGAGAGAAGA
AAGAGCGGTTCAGCCTGATCCTGGAAAGCGCCAGCACCAACCAGACCAGCATGT
ACCTGTGCGCCAGCAGAGGCCTGGCCGGCTACGAGCAGTATTTTGGCCCTGG
CACCCGGCTGACCGTGACCGaagatetgaacaaggtgttccctccagaggtggccgtgttcgagccttctaaggccg
agategeccacacacaaaaagecaccctcgtgtgcctggccaceggettttteccegaccacgtggaactgtcttggtgggtcaac
ggcaaagaggtgcactecggcgtgtcaacggatccccagcctctgaaagaacagcctgecctgaacgacagecggtactgcctg
agctecagactgagagtgtccgccaccttctggcagaacccccggaaccacttcagatgccaggtgcagttttacggcctgagcga
gaacgacgagtggacccaggacagagccaagecegtgacacaaategtgtctgecgaagcctggggaagagccgattgegg
catcaccagcgcetectatcaccagggegtgctgagcgecacaatcctgtacgaaatcctgctgggcaaggccaccctgtacgec
gtgctggtgtctgctctggtgctgatggecatggtcaagcggaaggactttggcageggcagagccaaaaggtccgggagcggIG
CGACAAACTTTAGCCTGTTGAAACAAGCCGGCGACGTTGAAGAGAACCCCGGACCTATG
AAGACCTTCGCCGGCTTCAGCTTCCTGTTCCTGTGGCTGCAGCTGGACTGCATGAGCAG
GGGCGAGGACGTGGAACAGAGCCTGTTTCTGAGCGTGCGCGAGGGCGACAGCAGCGTG
ATCAATTGCACCTACACCGACAGCTCCAGCACCTACCTGTACTGGTACAA
GCAGGAACCTGGCGCCGGACTGCAGCTGCTGACCTACATCTTCAGCAACATGGACATGA
AGCAGGACCAGAGACTGACCGTGCTGCTGAACAAGAAGGACAAGCACCTGAGCCTGCG
GATCGCCGATACCCAGACAGGCGACAGCGCCATCTACTTTTGCGCCGAGAGCATCGGCA
GCAACAGCGGCTACGCCCTGAACTTCGGCAAGGGCACAAGCCTGCTCGTGACCCCTCac
atccagaacccegaccccgecgtgtaccagctgagggactccaagtccagcgacaagagcgtgtgtctgtttacggacttcgaca
gccagaccaacgtgagtcaaagcaaggacagcgacgtctacataacggataagaccgtgctggacatgcggagcatggacttc
aagagcaacagegecgtggcctggtccaacaagagcgacttegeetgegecaacgcettcaacaacagcatcatccccgagg
acaccttetteccagcagegacgtgccctgcgacgtgaaactggtggagaagtccttcgagacagacaccaatctgaactttcag
aacctgctggtgatcgtgctgcggattctgctgctgaaagtggccggcttcaatctgctgatgaccctgcggctgtggagc

Complete Beta and Alpha ORF Protein Sequence (The underlined italic region in the "FurinP2A" site allows expression of two polypeptide chains in a single cassette)

MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQD**<u>MDHEN</u>**MFWYR
QDPGLGLRLIYF**<u>SYDVKM</u>**KEKGDIPEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYL**<u>CASR</u>**

GLAGYEQYFGPGTRLTVTEdlnkvfppevavfepskaeiahtqkatlvclatgffpdhvelswwvngkevhsgv
stdpqplkeqpalndsryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradcgitsasyhqgv
lsatilyeillgkatlyavlvsalvlmamvkrkdfgsgrakrsgsgATNFSLLKQAGDVEENPGPMKTFAGFSF
LFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYT**DSSSTY**LYWYKQEPGAGLQ
LLTY**IFSNMDM**KQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYF**CAESIGSNSGYAL**
NFGKGTSLLVTPHiqnpdpavyqlrdskssdksvclftdfdsqtnvsqskdsdvyitdktvldmrsmdfksnsavaws
nksdfacanafnnsiipedtffpssdvpcdvklveksfetdtnlnfqnllvivlrilllkvagfnllmtlrlws



* Para algunos vectores representados, el promotor de MSCV está en negrita. La cadena beta se ha comentado en negritas y cursiva. La cadena alfa se ha comentado con texto en negritas y subrayado. La marca de enriquecimiento de CD34 (marca Q) se ha anotado en cursiva y texto subrayado. CD8-alfa está en cursiva. CD8-beta está subrayado.

* En las Tablas 1-4 se incluyen epítopos peptídicos, así como moléculas de polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más identidad en su longitud completa con una secuencia de aminoácidos de cualquiera las secuencias que se enumeran en la Tabla 1, o una porción de las mismas. Dichos polipéptidos pueden tener la función del polipéptido o péptido de longitud completa, como se describirá adicionalmente en la presente.

* En las Tablas 1-4 se incluyen moléculas de ácido nucleico ARN (por ejemplo, con timinas reemplazadas por uridinas), moléculas de ácido nucleico que codifican ortólogos de las proteínas codificadas, así como secuencias de ácidos nucleicos de ADN o ARN que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que presenta por lo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más de identidad en toda su longitud completa con la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de las secuencias que se mencionan en las Tablas 1-4, o una parte de las mismas. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden presentar la función del ácido nucleico de longitud completa como se describirá adicionalmente en la presente.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión provistas en la presente comprenden una región constante que es quimérica, humanizada, humana, de primate o de roedor (por ejemplo, de rata o de ratón). Por ejemplo, se puede quimerizar una región variable humana con una región constante de murino o se puede humanizar una región variable de murino con una región constante humana y/o regiones de marco humanas. En algunas formas de realización, las regiones constantes se pueden mutar para modificar la funcionalidad (por ejemplo, se pueden introducir sustituciones de cisteínas no naturales en ubicaciones de residuos opuestos en las cadenas alfa y beta del TCR para proveer enlaces disulfuro que son útiles para aumentar la afinidad entre dichas cadenas alfa y beta del TCR). De manera similar, se pueden efectuar mutaciones en el dominio transmembrana de la región constante para modificar la funcionalidad (por ejemplo, para aumentar la hidrofobicidad mediante introducción de una sustitución no natural de un residuo por un aminoácido hidrofóbico). En algunas formas de realización, cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos, o una combinación de las mismas en comparación con una secuencia de CDR de referencia. En algunas formas de realización, las mutaciones se pueden efectuar en la región constante para aumentar la expresión sobre la superficie celular.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión que se divulgan en la presente pueden ser andamiajes de proteínas modificadas, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpos TCR miméticos y semejantes. Dichas unidades de unión se pueden diseñar y/o generar contra los péptidos y/o complejos de MHC-péptido que se describen en la presente usando métodos inmunológicos de rutina, tales como inmunización

de un huésped, obtención de células productoras de anticuerpos y/o anticuerpos contra las mismas y generación de hibridomas de utilidad para producir anticuerpos monoclonales (por ejemplo, Watt y col*.,* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24: 177-183; Gebauer y Skerra (2009) *Curr. Opin. Chem Biol.,* 13: 245-255; Skerra y col*.,* (2008) *FEBS J.* 275: 2677-2683; Nygren y col*.,* (2008) *FEBS J.* 275: 2668-2676; Dana y col*.,* (2012) *Exp. Rev. Mol. Med.* 14: e6; Sergeva y col*.,* (2011) *Blood* 117: 4262-4272; publicaciones PCT Nº WO 2007/143104, PCT/US86/02269 y WO 86/01533; Patente de los EEUU N°: 4.816.567; Better y col*.,* (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu y col*.,* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 3439-3443; Liu y col*.,* (1987) *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun y col*.,* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 214-218; Nishimura y col*.,* (1987) *Cancer Res.,* 47: 999-1005; Wood y col*.,* (1985) *Nature* 314: 446-449; Shaw y col*.,* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559); Morrison, S. L. (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi y col*.,* (1986) *Biotechniques* 4: 214; Patente de los EEUU N°: 5.225.539; Jones y col*.,* (1986) *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan y col*.,* (1988) *Science* 239: 1534; y Beidler y col*.,* (1988) *J. Immunol.* 141: 4053-4060. Si se desea, las unidades de unión se pueden aislar o purificar usando procedimientos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad, precipitación por sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía en lectina y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, o *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y.).

Los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” abarcan en un sentido amplio formas naturales de anticuerpos (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos, así como fragmentos y derivados de todos los anteriores, cuyos fragmentos y derivados tienen por lo menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpos pueden comprender una proteína o una unidad química conjugada con un anticuerpo.

Además, los intrabodies son moléculas de unión a antígeno bien conocidas que presentan las características de los anticuerpos, pero que se pueden expresar en las células con el fin de unirse y/o inhibir dianas intracelulares de interés (Chen y col*.,* (1994) *Human Gene Ther.,* 5: 595-601). Hay métodos bien conocidas en la materia para adaptar los anticuerpos a las

unidades intracelulares diana (por ejemplo, inhibir), tal como el uso de anticuerpos de cadena simple (scFv), modificación de los dominios VL de inmunoglobulina para la hiperestabilidad, modificación de los anticuerpos para resistir la reducción en el entorno intracelular, generación de proteínas de fusión que aumentan la estabilidad intracelular y/o modulan la localización intracelular, y semejantes. Los anticuerpos intracelulares también se pueden introducir y expresar en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo, con fines profilácticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como una terapia génica) (véase, por lo menos, las publicaciones PCT Nº WO 08/020079, WO 94/02610, WO 95/22618 y WO 03/014960; la Patente de los EEUU N°: 7.004.940; Cattaneo y Biocca (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications* (Landes y Springer-Verlag publs.); Kontermann (2004) *Methods* 34: 163-170; Cohen y col*.,* (1998) *Oncogene* 17: 2445-2456; Auf der Maur y col*.,* (2001) *FEBS Lett.,* 508: 407-412; Shaki-Loewenstein y col*.,* (2005) *J. Immunol. Meth.* 303: 19-39).

El término “anticuerpo”, como se usa en la presente, también incluye una “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”). El término “porción de unión a antígeno”, tal como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse de manera específica y/o selectiva a un antígeno (por ejemplo, un péptido y/o un complejo de MHC-péptido descritos en la presente). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos por el término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse entre sí usando un conector sintético que les permita prepararlos como una sola cadena de proteína, donde las regiones VL y VH se apareen para formar polipéptidos monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple

(scFv); véanse, por ejemplo, Bird y col*.,* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston y col*.,* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883); y Osbourn *y col.,* 1998, *Nature Biotechnology* 16: 778). Dichos anticuerpos de cadena simple también se consideran incluidos en el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Se puede unir cualquiera de las secuencias VH y VL de un scFv específico al ADNc de una región constante de una inmunoglobulina humana o secuencias genómicas, con el fin de generar vectores de expresión que codifican polipéptidos IgG completos u otros isotipos. Las VH y VL también se pueden usar en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de inmunoglobulinas usando ya sea química de proteínas o tecnología de ADN recombinante. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los anticuerpos bivalentes o *diabodies*. Los diabodies son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, con lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak y col*.,* (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

Aún más, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede ser parte de polipéptidos de inmunoadhesión más grandes, formadas por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de estos polipéptidos de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar un polipéptido scFv tetramérico (Kipriyanov y col*.,* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido de una subunidad de una proteína y una marca de polihistidina C-terminal para preparar polipéptidos scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov y col*.,* (1994) *Mol. Immunol.,* 31: 1047-1058). Las porciones de los anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Más aun, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y los polipéptidos de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante, como se describe en la presente.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos o singénicos; o formas modificadas de los mismos (por ejemplo, humanizados, quiméricos, etc.).

Los anticuerpos también pueden ser completamente humanos. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención se unen de manera específica y/o selectiva o de manera sustancialmente específica y/o selectiva a un péptido y/o a un complejo de MHC-péptido descritos en la presente. Los términos “anticuerpos monoclonales” y “composición de anticuerpos monoclonales”, como se usan en la presente, se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de reaccionar inmunológicamente con un epítopo particular de un antígeno, en tanto los términos “anticuerpos policlonales” y “composición de anticuerpos policlonales” se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpos que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpos monoclonales típicamente presenta una sola afinidad de unión por un antígeno particular con el cual reacciona inmunológicamente.

De manera similar a otras unidades de unión que se describen en la presente, los anticuerpos también pueden ser “humanizados”, que pretenden incluir anticuerpos elaborados por una célula no humana que tienen regiones variables y constantes que han sido alteradas para asemejarse más a los anticuerpos que serían elaborados por una célula humana. Por ejemplo, mediante alteración de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo no humana para incorporar los aminoácidos presentes en las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro*/*ex vivo* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. El término “anticuerpo humanizado”, como se usa en la presente, también incluye anticuerpos en los cuales se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, en las secuencias de marco humanas.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión divulgadas en la presente pueden comprender un receptor de célula T (TCR), un fragmento de unión a antígeno de un TCR o un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas formas de realización, la proteína de unión divulgada en la presente puede comprender dos cadenas de polipéptidos, cada una de las cuales comprende una región variable que comprende una CDR3 de una cadena alfa de un TCR y una CDR3 de una cadena beta de un TCR o una CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena

alfa y de una cadena beta de un TCR. En algunas formas de realización, una proteína de unión comprende un TCR de cadena simple (TCRcs), que comprende ambos dominios TCR V_α y TCR V_β, pero solo un dominio constante solamente de un TCR (C_α o C_β). El término "receptor de antígeno quimérico" (CAR) se refiere a una proteína de fusión modificada para contener dos o más secuencias de aminoácidos naturales unidas entre sí de una manera no natural o que no es natural en una célula huésped, donde dicha proteína de fusión puede funcionar como un receptor cuando está presente sobre la superficie de una célula. Los CAR incluidos en la presente invención pueden comprender una porción extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno (es decir, obtenida o derivada de una inmunoglobulina o una molécula tipo inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o un TCR, o un dominio de unión a antígeno derivado u obtenido de un inmunorreceptor asesino de una célula NK) unido a un dominio transmembrana y uno o más dominios de señalización intracelular (que opcionalmente contiene uno o más dominios coestimulantes) (véase, por ejemplo, Sadelain y col., (2013) *Cancer Discov.;* 3: 388, Harris y Kranz (2016) *Trends Pharmacol. Sci.* 37: 220, y Stone y col., (2014) *Cancer Immunol. Immunother.* 63: 1163).

En algunas formas de realización, 1) la CDR de la cadena alfa de un TCR, el dominio V_α de un TCR y/o una cadena alfa de un TCR están codificados por un gen TRAV, TRAJ y/o TRAC o un fragmento de los mismos seleccionados del grupo de genes TRAV, TRAJ y TRAC que se mencionan en la Tabla 2, y/o 2) la CDR de la cadena beta de un TCR, el dominio V_β de un TCR y/o la cadena beta de un TCR están codificados por un gen TRBV, TRBJ y/o TRBC o un fragmento de los mismos seleccionados del grupo de genes TRBV, TRBJ y TRBC que se mencionan en la Tabla 2, y/o 3) cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos, o una combinación de las mismas, en comparación con la secuencia de CDR de referencia cognada que se enumera en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión (por ejemplo, el TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR o un receptor de antígeno quimérico (CAR)) divulgadas en la presente son quiméricas (por ejemplo, comprenden residuos o motivos de aminoácidos de más de un donante o especie), humanizadas (por ejemplo, comprenden residuos de un organismo no humano alteradas o sustituidas a fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad en un ser humano) o humanas.

Los métodos para producir proteínas de unión modificadas, tales como TCR, CAR, y

fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son bien conocidas en la materia (por ejemplo, Bowerman y col., (2009) *Mol. Immunol.* 5: 3000, Patente de los EEUU N°: 6.410.319, Patente de los EEUU N°: 7.446.191, publicación de Patente de los EEUU N°: 2010/065818; Patente de los EEUU N°: 8.822.647, publicación PCT Nº WO 2014/031687, Patente de los EEUU N°: 7.514.537, y Brentjens y col., (2007) *Clin. Cancer Res.,* 73: 5426).

En algunas formas de realización, la proteína de unión descrita en la presente es un TCR, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es expresada sobre una superficie celular, en donde el TCR expresado sobre la superficie celular se puede asociar de manera más eficiente con una proteína CD3 en comparación con un TCR endógeno. Cuando una proteína de unión incluida en la presente invención, tal como un TCR, es expresada sobre la superficie de una célula tal como una célula T, también puede presentar una mayor expresión sobre la superficie de la célula en comparación con una proteína de unión endógena, tal como un TCR endógeno. En algunas formas de realización, en la presente se provee un CAR, en donde el dominio de unión del CAR comprende un dominio de unión del TCR específico del antígeno (véase, por ejemplo, Walseng y col., (2017) *Scientific Reports* 7: 10713).

También se proveen proteínas de unión modificadas (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión a antígeno de TCR, o CAR) que se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos usando una proteína de unión que tiene una o más de las secuencias V_α y/o V_β que se divulgan en la presente como material de partida para manipular una proteína de unión modificada que puede presentar propiedades alteradas con respecto a la proteína de unión de partida. La proteína de unión se puede manipular mediante modificación de uno o más residuos en una o ambas regiones variables (es decir, V_α y/o V_β), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones de marco. Además, o como alternativa, la proteína de unión se puede manipular mediante modificación de residuos en las región(es) constante(s).

Otro tipo de modificación de la región variable comprende mutar residuos de aminoácidos en las regiones V_α y/o V_β CDR1, CDR2 y/o CDR3 para así mejorar una o más propiedades de unión (por ejemplo, la afinidad) de la proteína de unión de interés. Se puede realizar una mutagénesis dirigida al sitio o una mutagénesis mediada por PCR para introducir una o más mutaciones y el efecto sobre la unión de la proteína, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar en ensayos *ex vivo*, o *in vivo* que se describen en la presente y se proveen en

los Ejemplos. En algunas formas de realización, se pueden introducir modificaciones conservadoras (como se describió antes). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. En algunas formas de realización, las mutaciones son sustituciones. Además, típicamente no se modifica más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos en una región de CDR.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión a antígeno de TCR, o CAR) que se describen en la presente pueden comprender una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos con relación a un TCR natural. En algunas formas de realización, cada CDR de la proteína de unión tiene hasta cinco sustituciones, inserciones, supresiones de aminoácidos, o una combinación de las mismas en comparación con la secuencia de CDR de referencia cognada que se enumera en la Tabla 2. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son bien conocidas y pueden ser naturales o se pueden introducir cuando la proteína de unión se produce de manera recombinante. Las sustituciones, supresiones y adiciones de aminoácidos se pueden introducir en una proteína usando métodos de mutagénesis conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY). Se pueden emplear procedimientos de mutagénesis específicos del sitio, dirigida a oligonucleótidos (o específica de segmentos) para proveer un polinucleótido alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, supresión o inserción deseada. Como alternativa, se pueden usar técnicas de mutagénesis aleatoria o de saturación, tal como mutagénesis por barrido de alanina, mutagénesis con una reacción en cadena de polimerasa sujeta a error, y mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para preparar variantes de polipéptidos inmunogénicas (véase, por ejemplo, Sambrook y col., supra).

Hay una variedad de criterios conocidos por el especialista para indicar si un aminoácido que está sustituido en una posición particular en un péptido o polipéptido es conservador (o similar). Por ejemplo, una sustitución por un aminoácido similar o un aminoácido conservador es aquella en donde un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Los aminoácidos similares se puede incluir en las siguientes categorías: aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); aminoácidos con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico); aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina,

asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, histidina); aminoácidos con cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano); aminoácidos con cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano). La prolina, que es considera como la más difícil de clasificar, comparte propiedades con aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (por ejemplo, leucina, valina, isoleucina y alanina). En algunas formas de realización, la sustitución de glutamina por ácido glutámico o asparagina por ácido aspártico pueden considerarse como una sustitución similar por cuanto la glutamina y la asparagina son derivados amida del ácido glutámico y del ácido aspártico, respectivamente. Como se comprenderá en la materia, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina mediante comparación de secuencias de aminoácidos y sustitutos de aminoácidos conservados en las mismas del polipéptido con respecto a la secuencia de un segundo polipéptido (por ejemplo, usando GENEWORKS™, Align, el algoritmo BLAST u otros algoritmos que se describen en la presente y se emplean en la materia).

En algunas formas de realización, una proteína de unión codificada (por ejemplo, TCR, fragmento de unión a antígeno de un TCR o CAR) puede comprender un “péptido señal” (también conocido como secuencia directriz, péptido directriz o péptido de tránsito). Los péptidos señal dirigen a los polipéptidos recién sintetizados a su ubicación apropiada dentro o fuera de la célula. El péptido señal se puede eliminar del polipéptido durante la localización o la secreción o una vez completadas. Los polipéptidos que tienen un péptido señal en la presente se denominan “pre-proteínas” y los polipéptidos en los cuales se ha eliminado el péptido señal en la presente se denominan proteínas o polipéptidos “maduros”. En algunas formas de realización, una proteína de unión (por ejemplo, TCR, fragmento de unión a antígeno de un TCR o CAR) descrita en la presente comprende un dominio V_α maduro, un dominio V_β maduro o ambos. En algunas formas de realización, una proteína de unión (por ejemplo, TCR, fragmento de unión a antígeno de un TCR o CAR) descrita en la presente comprende una cadena β de TCR madura, una cadena α de TCR madura o ambas.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión son proteínas de fusión que comprenden: (a) un componente extracelular que comprende un TCR o fragmento de unión a antígeno del mismo; (b) un componente intracelular que comprende un dominio efector o una

porción funcional del mismo; y (c) un dominio transmembrana que une los componentes extracelular e intracelular. En algunas formas de realización, la proteína de fusión se puede unir (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula del MHC de clase I). En algunas formas de realización, la molécula de MHC comprende una cadena alfa de un MHC que es de un serotipo HLA-A*01 de HLA. En algunas formas de realización, el alelo de HLA se selecciona del grupo que consiste en HLA-A*01:01.

Como se usa en la presente, un “dominio efector” o un “dominio efector inmunológico” es una porción o dominio intracelular de una proteína de fusión o receptor que puede promover de manera directa o indirecta una respuesta inmunológica en una célula cuando recibe la señal apropiada. En algunas formas de realización, un dominio efector es de una proteína de una célula inmunológica, o una porción de la misma, o de un complejo de proteínas de una célula inmunológica que recibe una señal cuando está unido (por ejemplo, CD3ζ), o cuando la proteína de la célula inmunológica, o una porción de la misma, o un complejo de proteínas de una célula inmunológica que se une de manera directa a una molécula diana y desencadena una transducción de señales del dominio efector en una célula inmunológica.

Un dominio efector puede promover de manera directa una respuesta celular cuando contiene uno o más dominios o motivos de señalización, tal como un motivo de activación basado en tirosina intracelular (ITAM), tales como los que se encuentran en moléculas coestimulantes. Sin vinculación a ninguna teoría, se cree que los ITAM son de utilidad para la activación de células T después de la unión del ligando por un receptor de célula T o por una proteína de fusión que comprende un dominio efector de una célula T. En algunas formas de realización, el componente intracelular, o una porción funcional del mismo, comprende un ITAM. Los ejemplos de dominios efectores inmunológicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, aquellos de CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD25, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, Wnt, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTα, TCRα, TCRβ, TRIM, Zap70, PTCH2, o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, un dominio efector comprende un dominio de señalización de un receptor de linfocitos (por ejemplo, CD3ζ o una porción funcional o una variante del mismo).

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

En algunas formas de realización, un dominio efector comprende un endodominio CD3ε, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD27 o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo, o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD28 o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo, o una variante funcional del mismo. En otras formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio 4-1BB, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio OX40, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD2, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio CD5, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio ICAM-I, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un endodominio LFA-I, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo. En formas de realización adicionales, un dominio efector comprende un

endodominio ICOS, o una porción funcional (por ejemplo, de señalización) del mismo o una variante funcional del mismo.

Un componente extracelular y un componente intracelular incluidos en la presente invención están unidos mediante un dominio transmembrana. Un "dominio transmembrana", como se usa en la presente, es una porción de una proteína transmembrana que se puede insertar en una membrana celular o puede abarcar una membrana celular. Los dominios transmembrana tienen una estructura tridimensional que es termodinámicamente estable en una membrana celular y en general su longitud varía en un rango entre aproximadamente 15 aminoácidos y aproximadamente 30 aminoácidos. La estructura de un dominio transmembrana puede comprender una hélice alfa, un barril beta, una lámina beta, una hélice beta o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el dominio transmembrana comprende o deriva de una proteína transmembrana conocida (por ejemplo, un dominio transmembrana CD4, un dominio transmembrana CD8, un dominio transmembrana CD27, un dominio transmembrana CD28 o cualquier combinación de los mismos).

En algunas formas de realización, el componente extracelular de la proteína de fusión comprende además un conector dispuesto entre el dominio de unión y el dominio transmembrana. Como se usa en la presente cuando se refiere a un componente de una proteína de fusión que conecta los dominios de unión y transmembrana, un “conector” puede ser una secuencia de aminoácidos que comprende entre aproximadamente dos aminoácidos y aproximadamente 500 aminoácidos, que puede proporcionar flexibilidad y espacio para el movimiento conformacional entre dos regiones, dominios, motivos, fragmentos o módulos unidos por el conector. Por ejemplo, un conector incluido en la presente invención puede ubicar el dominio de unión alejado de la superficie de una célula huésped que expresa la proteína de fusión a fin de permitir un contacto apropiado entre la célula huésped y una célula diana, unión a antígeno y activación (Patel y col., (1999) *Gene Terapia* 6: 412-419). La longitud del conector se puede variar para maximizar el reconocimiento del antígeno en base a la molécula diana seleccionada, el epítopo de unión seleccionado o el tamaño y la afinidad del dominio de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Guest y col., (2005) *Immunother.,* 28: 203-11 y la publicación PCT Nº WO 2014/031687). Los ejemplos de conectores incluyen aquellos que tienen una cadena de aminoácidos de glicina-serina que comprende entre aproximadamente uno y diez repeticiones de Gly_xSer_y, en donde x e y son cada uno de

manera independiente un número entero entre 0 y 10, siempre que x e y no sean ambos 0 (por ejemplo, $(Gly_4Ser)_2$, $(Gly_3Ser)_2$, Gly_2Ser o una combinación de los mismos, tal como $((Gly_3Ser)_2Gly_2Ser)$).

Una proteína de unión se puede conjugar con un agente, por ejemplo, un con una unidad de detección, un radiosensibilizador, un fotosensibilizador y otros similares, y/o puede ser modificada químicamente según se describió anteriormente con respecto a los péptidos.

Las proteínas de unión incluidas en la presente invención se pueden, en algunas formas de realización, unir de manera covalente a una unidad. En algunas formas de realización, la unidad unida de manera covalente comprende una etiqueta o marca de afinidad. La marca de afinidad se puede seleccionar del grupo que consiste en glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a calmodulina (CBP), una marca de proteína C, una marca Myc, una marca Halo, una marca HA, una marca Flag, una marca His, una marca de biotina y una marca V5. La marca puede ser una proteína fluorescente. En algunas formas de realización, la unidad unida de manera covalente se selecciona del grupo que consiste en un agente inflamatorio, un agente antiinflamatorio, una citoquina, una toxina, una molécula citotóxica, un isótopo radioactivo o un anticuerpo tal como un Fv de cadena simple.

La proteína de unión se puede conjugar a un agente usado en el diagnóstico por imágenes, investigación, terapia terapéutica, técnica teranóstica, terapia farmacéutica, quimioterapia, terapia de quelación, administración dirigida de fármacos y una radioterapia. En algunas formas de realización, la proteína de unión se puede conjugar o fusionar con agentes detectables, tales como un fluoróforo, un indicador del infrarrojo cercano, un agente de contraste, una nanopartícula, una nanopartícula que contiene un metal, un quelato de metales, un agente de contraste para rayos X, un agente para PET, un metal, un radioisótopo, un indicador, un quelante de radionúclidos u otro material adecuado que se puede usar en el diagnóstico por imágenes. En algunas formas de realización, se pueden unir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más unidades detectables a una proteína de unión. Los ejemplos no taxativos de radioisótopos incluyen emisores de radiación alfa, emisores de radiación beta, emisores de positrones y emisores de radiación gamma. En algunas formas de realización, el metal o radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio, cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio, polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio, talio e itrio. En algunas formas de realización, el metal es

actinio, bismuto, plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas formas de realización, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212. En algunas formas de realización, los tejidos y fluidos biológicos no extinguen fácilmente los colorantes del infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el fluoróforo es un agente fluorescente que emite radiación electromagnética a una longitud de onda de entre 650 nm y 4000 nm, y dichas emisiones se usan para detectar un agente tal. Los ejemplos no taxativos de indicadores fluorescentes que se pueden usar como molécula de conjugación incluyen DyLight-680, DyLight-750, VivoTag-750, DyLight-800, IRDye-800, VivoTag-680, Cy5,5, ZQ800 o indocianina verde (ICG). En algunas formas de realización, los colorantes del infrarrojo cercano a menudo incluyen colorantes de cianina (por ejemplo, Cy7, Cy5,5 y Cy5). Adicionalmente, los ejemplos no taxativos de indicadores fluorescentes para usar como molécula de conjugación de acuerdo con la presente invención incluyen acradina naranja o amarilla, Alexa Fluors® (por ejemplo, Alexa Fluor® 790, 750, 700, 680, 660 y 647) y cualquier derivado de las mismas, 7-actinomicina D, ácido 8-anilinonaftalen-1-sulfónico, un indicador ATTO® y cualquier derivado del mismo, tinción con auramina-rodamina y cualquier derivado de las mismas, bensantrona, bimano, 9-10-bis(feniletinil)antraceno, 5,12-bis(feniletinil)naftaceno, bisbencimida, Brainbow, calceína, carboxifluoresceína y cualquier derivado de los mismos, 1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno y cualquier derivado de los mismos, DAPI, DiOC6, DyLight® Fluors® y cualquier derivado de los mismos, epicocconona, bromuro de etidio, FlAsH-EDT2®, indicador Fluo y cualquier derivado de los mismos, FluoProbe® y cualquier derivado de los mismos, fluoresceína y cualquier derivado de la misma, Fura® y cualquier derivado del mismo, GelGreen® y cualquier derivado del mismo, GelRed® y cualquier derivado del mismo, proteínas fluorescentes y cualquier derivado de las mismas, proteínas de la isoforma m y cualquier derivado de las mismas tal como por ejemplo, mCherry, indicador de hetametina y cualquier derivado de la misma, tintura de Hoeschst, iminocoumarina, amarillo indio, indo-1 y cualquier derivado del mismo, Laurdan, amarillo Lucifer y cualquier derivado de los mismos, luciferina y cualquier derivado de la misma, luciferasa y cualquier derivado de la misma, mercocianina y cualquier derivado de la misma, indicadores del Nilo y cualquier derivado de los mismos, perileno, floxina, indicador fico y cualquier derivado del mismo, ioduro de propidio, piranina, rodamina y cualquier derivado de los mismos, Ribogreen, RoGFP, rubreno, estilbeno y cualquier derivado de los mismos, sulforodamina y cualquier derivado de la misma, SYBR y

cualquier derivado del mismo, Synapto-pHluorin, tetrafenilbutadieno, Tris tetrasódico, rojo Texas, amarillo Titan, TSQ, umbeliferona, violantrona, proteína fluorescente amarilla y YOYO-1. Otros indicadores fluorescentes adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, fluoresceína y indicadores de fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína isotiocianina o FITC, naftofluoresceína, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína o FAM, etc.), carbocianina, merocianina, indicadores de estirilo, indicadores de oxonol, ficoeritrina, ertrosina, eosina, indicadores de rodamina (por ejemplo, carboxitetrametil-rodamina o TAMRA, carboxirodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), lissamina rodamina B, rodamina 6G, rodamina Verde, rodamina Roja, tetrametilrodamina (TMR), etc.), coumarina y indicadores de coumarina (por ejemplo, metoxicoumarina, dialquilaminocoumarina, hidroxicoumarina, aminometilcoumarina (AMCA), etc.), indicadores Oregon Green™ (por ejemplo, Oregon Green™ 488, 500, 514., etc.), Texas Red®, Texas Red®-X, SPECTRUM RED®, SPECTRUM GREEN®, indicadores de cianina (por ejemplo, CY-3, Cy-5, CY-3,5, CY-5,5, etc.), indicadores de Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 350, 488, 532, 546, 568, 594, 633, 660, 680, etc.), indicadores BODIPY® (por ejemplo, BODIPY® FL, R6G, TMR, TR, 530/550, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650, 650/665, etc.), indicadores IRD (por ejemplo, IRD40™, IRD700™, IRD800™, etc.) y semejantes. Otros agentes detectables adicionales adecuados son bien conocidos en el arte (por ejemplo, publicación PCT Nº PCT/US14/56177). Los ejemplos no taxativos de radioisótopos incluyen emisores de radiación alfa, emisores de radiación beta, emisores de positrones y emisores de radiación gamma. En algunas formas de realización, el metal o radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en actinio, americio, bismuto, cadmio, cesio, cobalto, europio, gadolinio, iridio, plomo, lutecio, manganeso, paladio, polonio, radio, rutenio, samario, estroncio, tecnecio, talio e itrio. En algunas formas de realización, el metal es actinio, bismuto, plomo, radio, estroncio, samario o itrio. En algunas formas de realización, el radioisótopo es actinio-225 o plomo-212.

Las proteínas de unión se pueden conjugar con un radiosensibilizador o un fotosensibilizador. Los ejemplos de radiosensibilizadores incluyen, pero en un sentido no taxativo: ABT-263, ABT-199, WEHI-539, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, gemcitabine, etanidazol, misonidazol, tirapazamina y derivados de bases de ácido nucleico (por ejemplo, purinas o pirimidinas halogenadas, tal como 5-fluorodesoxiuridina). Los ejemplos de fotosensibilizadores incluyen, pero en un sentido no taxativo: moléculas o esferas fluorescentes que generan calor

cuando se las ilumina, nanopartículas, porfirinas y derivados de porfirina (por ejemplo, clorinas, bacterioclorinas, isobacterioclorinas, ftalocianinas y naftalocianinas), metaloporfirinas, metaloftalocianinas, angelicinas, colorantes de chalcogenapirrilio, clorofilas, coumarinas, flavinas y compuestos relacionados tales como aloxazina y riboflavina, fullerenos, feofórbidos, pirofeofórbidos, cianinas (por ejemplo, merocianina 540), feofitinas, sapfirinas, texafirinas, purpurinas, porficenos, fenotiazinios, derivados de azul de metileno, naftalimidas, derivados de azul Nilo, quinonas, perilenquinonas (por ejemplo, hipericinas, hipocrellinas y cercosporinas), psoralenos, quinonas, retinoides, rodaminas, tiofenos, verdinas, colorantes de xanteno (por ejemplo, eosinas, eritrosinas, rosa Bengalas), formas diméricas y oligoméricas de porfirinas, y profármacos tal como el ácido 5-aminolevulínico. Ventajosamente, este enfoque permite un direccionamente altamente específico de las células de interés (por ejemplo, células inmunológicas) usando un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco) y energía electromagnética (por ejemplo, radiación o luz) de manera concurrente. En algunas formas de realización, la proteína de unión se fusiona o se une de manera covalente o de manera no covalente al agente, por ejemplo, directamente o por medio de un conector.

En algunas formas de realización, la proteína de unión se puede modificar químicamente. Por ejemplo, la proteína de unión se puede mutar para modificar las propiedades de los péptidos, tales como la detectabilidad, estabilidad, biodistribución, farmacocinética, vida media, carga de superficie, hidrofobicidad, sitios de conjugación, pH, función y semejantes. La N-metilación es un ejemplo de metilación que puede tener lugar en una proteína de unión incluida en la presente invención. En algunas formas de realización, la proteína de unión se puede modificar mediante metilación en aminas libres, tal como mediante metilación reductora con formaldehído y cianoborohidruro de sodio.

Una modificación química puede comprender un polímero, un poliéter, polietilenglicol, un biopolímero, un polímero zwiteriónico, un poliaminoácido, un ácido graso, un dendrímero, una región Fc, una cadena carbonada saturada simple tal como palmitato o miristolato, o albúmina. La modificación química de una proteína de unión con una región Fc puede ser una proteína de fusión Fc. Un poliaminoácido puede incluir, por ejemplo, una secuencia de poliaminoácidos con aminoácidos individuales repetidos (por ejemplo, poliglicina), y una secuencia de poliaminoácidos con secuencias de poliaminoácidos mixtos que pueden seguir, o no, un patrón, o cualquier combinación de los precedentes.

En algunas formas de realización, se pueden modificar las proteínas de unión incluidas en la presente invención. En algunas formas de realización, las modificaciones tienen una identidad de secuencia sustancial o significativa con una proteína de unión parental como para generar una variante funcional que mantiene una o más actividades biofísicas y/o biológicas de la proteína de unión parental (por ejemplo, mantiene la especificidad de unión a pMCH). En algunas formas de realización, la mutación es una sustitución de aminoácido conservadora.

En algunas formas de realización, las proteínas de unión incluidas en la presente invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Dichos aminoácidos sintéticos son bien conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexancarboxílico, norleucina, ácido α-amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β-fenilserina β-hidroxifenilalanina, fenilglicina, α-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, ácido aminomalónico monoamida, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α-aminociclopentancarboxílico, ácido α-aminociclohexancarboxílico, ácido α-aminocicloheptancarboxílico, ácido α-(2-amino-2-norbornan)-carboxílico, ácido α,γ-diaminobutírico, ácido α,β-diaminopropiónico, homofenilalanina y α-ter-butilglicina.

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

En algunas formas de realización, la unión de una unidad hidrofóbica, tal como al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a un aminoácido interno, se puede usar para extender la vida media de un péptido comprendido en la presente invención. En otras formas de realización, la proteína de unión puede incluir modificaciones de postraducción (por ejemplo, metilación y/o amidación), que pueden afectar, por ejemplo, la vida media en suero. En algunas formas de realización, se pueden conjugar cadenas carbonadas simples (por ejemplo, mediante miristoilación y/o palmitilación) con las proteínas de unión. En algunas formas de realización, las cadenas carbonadas simples pueden volver a las proteínas de unión fácilmente separables del material no conjugado. Por ejemplo, los métodos que se pueden usar para separar las proteínas de unión del material no conjugado incluyen, pero en un sentido no

taxativo, extracción con solvente y cromatografía de fase reversa. Las unidades lipofílicas pueden extender la vida media por medio de una unión reversible a albúmina de suero. Las unidades conjugadas pueden ser unidades lipofílicas que extienden la vida media de los péptidos por medio de una unión reversible a albúmina de suero. En algunas formas de realización, la unidad lipofílica puede ser colesterol o un derivado de colesterol, inclusive colestenos, colestanos, colestadienos y oxiesteroles. En algunas formas de realización, las proteínas de unión se pueden conjugar con ácido mirístico (ácido tetradecanoico) o un derivado del mismo. En otras formas de realización, la proteína de unión se puede acoplar (por ejemplo, conjugar) a un agente modificador de la vida media. Los ejemplos de agentes modificadores de la vida media incluyen, pero en un sentido no taxativo: un polímero, un polietilenglicol (PEG), un almidón de hidroxietilo, alcohol polivinílico, un polímero soluble en agua, un polímero zwiteriónico soluble en agua, un poli(aminoácido) soluble en agua, un polímero de prolina, alanina y serina soluble en agua, un polímero soluble en agua que contiene glicina, ácido glutámico y serina, una región Fc, un ácido graso, ácido palmítico, o una molécula que se une a albúmina. En algunas formas de realización, se puede acoplar un espaciador o conector a una proteína de unión, tal como 1, 2, 3, 4 o más residuos de aminoácidos, que sirven como un espaciador o conector con el fin de facilitar la conjugación o fusión a otra molécula, así como para facilitar la escisión del péptido de dichas moléculas conjugadas o fusionadas. En algunas formas de realización, las proteínas de unión se pueden conjugar con otras unidades que pueden, por ejemplo, modificar o efectuar cambios en las propiedades de las proteínas de unión.

Una proteína de unión se puede producir de manera recombinante o sintética, tal como mediante síntesis de péptidos en fase sólida o síntesis de péptidos en fase de solución. La síntesis de polipéptidos se puede efectuar mediante métodos de síntesis conocidos, tal como usando química de fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) o química de butiloxicarbonilo (Boc). Los fragmentos de polipéptidos se pueden unir entre sí enzimáticamente o mediante síntesis.

En un aspecto de la presente invención, aquí se proveen métodos para producir una proteína de unión descrita en la presente, que comprende los pasos de: (i) cultivar una célula huésped transformada que ha sido transformada mediante un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de unión descrita en la presente bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicha proteína de unión; y (ii) recuperar la proteína de

unión expresada.

Los métodos que son de utilidad para aislar y purificar la proteína de unión producida de manera recombinante pueden incluir, a modo de ejemplo, obtener los sobrenadantes de sistemas de célula huésped/vector adecuados que secretan la proteína de unión hacia el medio de cultivo y luego concentrar el medio usando un filtro disponible comercialmente. Después de la concentración, el concentrado se puede aplicar a una sola matriz de purificación adecuada o a una serie de matrices adecuadas, tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Se puede emplear uno o más pasos de HPLC de fase reversa para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante. Estos métodos de purificación también se pueden emplear para aislar un inmunógeno de su entorno natural. Los métodos de una producción a gran escala de una o más de las proteínas de unión que se describen en la presente incluyen cultivo celular por lotes, que se monitorea y controla para mantener las condiciones de cultivo apropiadas. La purificación de la proteína de unión se puede efectuar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente y que son conocidos en el arte. En cualquiera de las formas de realización que se divulgan en la presente, la proteína de unión codificada se puede unir a un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula del MHC de clase I). En algunas formas de realización, la molécula de MHC comprende una cadena alfa de un MHC que es de un serotipo HLA-A*02 de HLA. En algunas formas de realización, el alelo de HLA se selecciona del grupo que consiste en los alelos HLA-A*02:01, HLA-A*02:02, HLA-A*02:03, HLA-A*02:05, HLA-A*02:06, y HLA-A*02:07. En algunas formas de realización específicas, el alelo HLA es HLA-A*02:01.

Hay una variedad de ensayos que son bien conocidos para avaluar la afinidad de unión y/o para determinar si una molécula de unión se une (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) a un ligando particular (por ejemplo, un complejo de antígeno peptídico-MHC). Es propio del nivel de un experto en el arte determinar la afinidad de unión de una proteína de unión por una diana, tal como un epítopo peptídico de células T de un polipéptido diana, tal como mediante el uso de cualquiera de numerosos de ensayos de unión que son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede usar un equipo Biacore™ para determinar la constante de unión de un complejo entre dos proteínas. La constante de disociación (K_D) del complejo se puede determinar mediante monitoreo de los

cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo que una solución amortiguadora pasa sobre el chip. Otros ensayos adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos tales como un ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA), o determinación de la unión mediante monitoreo del cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de las proteínas por medio de fluorescencia, absorción UV, dicroismo circular o resonancia magnética nuclear (RMN). Otros ejemplos de ensayos incluyen, pero en un sentido no taxativo, transferencia Western, ELISA, ultracentrifugación analítica, espectroscopía y análisis mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore™) (véase, por ejemplo, Scatchard y col., (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660, Wilson (2002) *Science* 295: 2103, Wolff y col., (1993) *Cancer Res.,* 53: 2560, y las Patentes de los EEUU N°: 5.283.173 y 5.468.614), citometría de flujo, secuenciación y otros métodos de detección de ácidos nucleicos expresados. En un ejemplo, se mide la afinidad aparente por una diana mediante evaluación de la unión a varias concentraciones de tetrámeros, por ejemplo, mediante citometría de flujo usando multímeros marcados, tal como tetrámeros de MHC-péptido antigénico. En un ejemplo representativo, K_D aparente de una proteína de unión se mide usando diluciones 2X de tetrámeros marcados en un rango de concentraciones, seguido por determinación de las curvas de unión mediante regresión no lineal, donde K_D aparente se determina como la concentración del ligando que dio como resultado la unión medio máxima.

VI. Ácidos nucleicos y vectores

En un aspecto incluido en la presente invención, aquí se proveen moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas aquí descritas, tales como los péptidos inmunogénicos MAGEA1 y fragmentos de los mismos, las moléculas MHC, las proteínas de unión (por ejemplo, TCR, fragmentos de unión a antígeno de los TCR, CAR y semejantes), y semejantes. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico se hibridiza, en condiciones severas, con el complemento de una secuencia que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad, tal como en toda la longitud completa, con un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en las Tablas 1-3.

En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico se hibridiza, en condiciones

severas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en las Tablas 1-3.

En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende (por ejemplo, comprende, consiste esencialmente en o consiste en) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de polipéptidos que se enumeran en las Tablas1-3.

En algunas formas de realización, la secuencia de ácidos nucleicos codifica los péptidos inmunogénicos MAGEA1 descritos en la presente.

En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de la cadena α de un TCR que se muestra en la Tabla 2. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_α de un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de un dominio V_α de un TCR que se muestra en la Tabla 2. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena α de un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de una cadena α de un TCR que se muestra en la Tabla 2.

En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos una (por ejemplo, una, dos o tres) CDR de la cadena β de un TCR que se muestra en la Tabla 2. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_β de un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con

una secuencia de un dominio V_β de un TCR que se muestra en la Tabla 2. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprenden (por ejemplo, comprenden, consisten esencialmente en o consisten en) una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena β de un TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad con una secuencia de una cadena β de un TCR que se muestra en la Tabla 2.

El término “ácido nucleico” incluye los términos “polinucleótido”, “oligonucleótido” y “molécula de ácido nucleico”, y en general se refieren a un polímero de ADN o ARN, que puede ser de hebra simple o de hebra doble, que se sintetizó o se obtuvo (por ejemplo, se aisló y/o purificó) a partir de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener un enlace natural, no natural o alterado entre nucleótidos, tal como un enlace fosforamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster que se encuentra entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En una forma de realización, el ácido nucleico comprende un ADN complementario (ADNc).

En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos comprendidos en la presente invención son recombinantes. Tal como se usa en la presente, el término “recombinante” se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas mediante la unión de segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos a moléculas de ácidos nucleicos que se pueden replicar en una célula viva, o (ii) moléculas que son el resultado de la replicación de las que se describieron antes en (i). A los efectos de la presente, la replicación puede ser una replicación *in vitro*/*ex vivo* o una replicación *in vivo*.

Los ácidos nucleicos se pueden construir en base a una síntesis química y/o mediante reacciones de ligación enzimáticas usando procedimientos conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook *y col.,* supra. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede sintetizar químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de diversas maneras que se diseñaron para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras una hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero en un sentido no taxativo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-

acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N^6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida con N^6, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N^6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos incluidos en la presente invención se pueden obtener de compañías, tal como Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).

En una forma de realización, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de codones optimizados. Sin limitaciones a una teoría o mecanismo particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficacia de traducción de los transcriptos de ARNm. La optimización de codones de la secuencia de nucleótidos puede involucrar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifica al mismo aminoácido, que puede ser traducido por el ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, aumentando así la eficacia de traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras secundarias de ARNm que podrían interferir con la traducción, aumentando de esa manera la eficacia de la traducción. En algunas formas de realización, las secuencias de nucleótidos que se describen en la presente tienen codones optimizados para su expresión en una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica, tal como una célula T).

La presente invención también provee un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente o una secuencia de nucleótidos que se hibridiza en condiciones severas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente.

La secuencia de nucleótidos que se hibridiza en condiciones severas se puede hibridizar en condiciones de gran severidad. Las “condiciones de gran severidad” significan que la secuencia de nucleótidos se hibridiza específica y/o selectivamente con una secuencia diana

(la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que una hibridación no específica. Las condiciones de gran severidad incluyen condiciones que permitirán distinguir un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que solo contiene unas pocas faltas de coincidencia dispersas, de una secuencia aleatoria que resultara tener unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidan con la secuencia de nucleótidos. Dichas regiones de complementariedad pequeñas se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y una hibridación de gran severidad las vuelve fácilmente distinguibles. Las condiciones de severidad relativamente altas incluirán, por ejemplo, condiciones bajas en sales y/o de temperatura alta, tal como provistas por NaCl 0,02-0,1 M aproximadamente o un valor equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Dichas condiciones de gran severidad toleran pocas, si algunas, faltas de coincidencia entre la secuencia de nucleótidos y el molde o la hebra diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR de la invención. Se puede apreciar en general que las condiciones se pueden volver más severas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

La presente invención también provee un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos que se describen en la presente.

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

Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” se refieren a un vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen foráneo) en una célula huésped, de modo tal de transformar al huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Por consiguiente, un objeto adicional de la presente invención se relaciona con un vector que comprende un ácido nucleico de la presente invención.

Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, un potenciador, un terminador y semejantes, para causar o dirigir la expresión de dicho

polipéptido tras su administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células de animales incluyen el promotor y potenciador tempranos de SV40 (Mizukami T. *y col.,* 1987), el promotor y potenciador LTR del virus de leucemia de ratones Moloney (Kuwana Y *y col.,* 1987), el promotor (Mason J O *y col.,* 1985) y el potenciador (Gillies S D *y col.,* 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y semejantes.

Se puede usar cualquier vector de expresión para células animales. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H *y col.,* 1990), pAGE103 (Mizukami T *y col.,* 1987), pHSG274 (Brady G *y col.,* 1984), pKCR (O'Hare K *y col.,* 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H *y col.,* 1990) y semejantes. Otros ejemplos de plásmidos representativos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos de integración, tales como por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y semejantes. Los ejemplos de vectores virales representativos incluyen vectores adenovirales, retrovirales, lentivirales, herpes virus y AAV. Dichos virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas conocidas en el arte, tal como mediante células empaquetadoras de virus o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células positivas para GPenv, células 293, *etc.* Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes de replicación defectuosa son bien conocidos en el arte y se pueden consultar, por ejemplo, en la publicación PCT WO 95/14785, la publicación PCT WO 96/22378, la Patente de los EEUU N°: 5.882.877, la Patente de los EEUU N°: 6.013.516, la Patente de los EEUU N°: 4.861.719, la Patente de los EEUU N°: 5.278.056 y la publicación PCT WO 94/19478.

En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína de unión o un polipéptido que se describe en la presente o un fragmento de los mismos. En algunas formas de realización, el ácido nucleico incluye los elementos reguladores necesarios para la expresión del marco de lectura abierto. Dichos elementos pueden incluir, por ejemplo, un promotor, un codón de inicio, un codón de terminación y una señal de poliadenilación. Además, se pueden incluir potenciadores. Estos elementos se pueden ligar operativamente a una secuencia que codifica la proteína de unión, un polipéptido o un fragmento de los mismos.

En algunas formas de realización, un vector comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8α, CD8β, un receptor de TGFβ II dominante negativo (por ejemplo,

un DN-TGFβRII), un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es dihidrofolato reductasa (DHFR). En determinadas formas de realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica CD8α, CD8β, el DN-TGFβR y/o el marcador de proteínas seleccionable está ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica una marca (por ejemplo, una marca de enriquecimiento en CD34). En formas de realización específicas, una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente, tal como una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un TCRα, TCRβ, CD8α, CD8β, DN-TGFβR y/o un marcador de proteínas seleccionable, está interconectada con un sitio de entrada a ribosomas interno o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido autoescindible, tal como P2A, E2A, F2A o T2A, etc.

En algunas formas de realización, el vector de expresión provisto en la presente comprende una secuencia de nucleótidos que es por lo menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos que se muestran en las Tablas 1-3.

Como se describió anteriormente, algunos ejemplos representativos de promotores incluyen, pero en un sentido no taxativo, promotores del virus 40 de simios (SV40), promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus de inmunodeficiencia de humano (VIH) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) de VIH, virus de Moloney, citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de CMV, virus de Epstein Barr (EBV), virus de Sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana y metalotioneína humana. Los ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR.

Además de los elementos reguladores necesarios para la expresión, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ácido nucleico. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. Los potenciadores incluyen los promotores que se describen en la presente. En algunas formas de realización, los potenciadores/promotores incluyen, por ejemplo, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana y potenciadores virales tales como aquellos de CMV, RSV y EBV.

En algunas formas de realización, el ácido nucleico se puede incorporar operativamente en un

vehículo o vector de administración como se describirá más adelante. Los vectores de administración útiles incluyen, pero en un sentido no taxativo, microcápsulas biodegradables, complejos de estimulación inmunológica (ISCOM) o liposomas, y vehículos vivos atenuados modificados genéticamente tales como virus o bacterias.

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

En algunas formas de realización, el vector de expresión recombinante puede administrar un polinucleótido en una célula huésped apropiada, por ejemplo, una célula T o una célula presentadora de antígenos, es decir, una célula que presenta un complejo de péptido/MHC sobre su superficie celular (por ejemplo, una célula dendrítica) y carece de CD8. En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula progenitora hematopoyética o una célula del sistema inmunológico humano. Por ejemplo, la célula del sistema inmunológico puede ser una célula T $CD4^+$, una célula T $CD8^+$, una célula T doble negativa CD4/CD8, una célula T gd, una célula asesina natural, una célula dendrítica o cualquier combinación de las mismas. En algunas formas de realización, en donde una célula T es el huésped, dicha célula T puede ser naive, una célula T de memoria central, una célula T de memoria efectora o cualquier combinación de las mismas. Por ende, los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir, por ejemplo, elementos reguladores de la transcripción específicos del tejido linfoide (TRE), tales como TRE específicos de linfocitos B, linfocitos T o células dendríticas. Los TRE específicos del tejido linfoide son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Thompson *y col.,* (1992) *Mol. Cell. Biol.* 72: 1043, Todd *y col.,* (1993) *J. Exp. Med.* 777: 1663, y Penix *y col.,* (1993) *J. Exp. Med.* 775: 1483).

En algunas formas de realización, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena α de un TCR, una cadena β de un TCR y/o un conector peptídico. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa de un TCR y la cadena beta de un TCR de longitud completa de la proteína de unión con un conector ubicado entre ellas, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta se encuentra hacia el extremo 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica la

cadena alfa. En algunas formas de realización, la secuencia de nucleótidos codifica las cadenas alfa de un TCR y beta de un TCR de longitud completa con un conector ubicado entre ellas, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta de un TCR se encuentra hacia el extremo 3 ' de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa de un TCR. En algunas formas de realización, las cadenas alfa de un TCR y/o la cadena beta de un TCR de longitud completa se reemplazan por fragmentos de las mismas.

Como también se describirá más adelante, otro aspecto incluido en la presente invención se relaciona con una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la presente invención. Una célula huésped puede incluir cualquier célula individual o cultivo celular que puede recibir un vector o la incorporación de ácidos nucleicos y/o proteínas, así como cualquier célula de la progenie. El término también abarca la progenie de la célula huésped, ya sea si son genéticamente o fenotípicamente iguales o diferentes. Las células huésped adecuadas pueden depender del vector y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de simios, células de insectos, células de levadura y células bacterianas. Estas células pueden ser inducidas para incorporar el vector u otro material mediante el uso de un vector viral, transformación por precipitación de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección u otros métodos (véase, por ejemplo, Sambrook *el al.,* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed.* (Cold Spring Harbor Laboratory)). El término “transformación” se refiere a la introducción de un gen “foráneo” (es decir, extrínseco o extracelular), una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, de manera que la célula huésped expresará el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por dicho gen o secuencia introducida. Una célula huésped que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido “transformada”.

Los ácidos nucleicos que son abarcados por la presente invención se pueden usar para producir un polipéptido recombinante incluido en la presente invención en un sistema de expresión adecuado. El término “sistema de expresión” se refiere a una célula huésped y un vector compatibles en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por el ADN foráneo portado por el vector e introducido en la célula huésped.

Los sistemas de expresión comunes incluyen células huéspedes de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores de *Baculovirus*, y células huésped y

vectores de mamífero. Otros ejemplos de células huésped incluyen, en un sentido no taxativo, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos celulares de mamífero primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las cuales un gen de dihidrofolato reductasa (de aquí en adelante referido como "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G y col; 1980), células YB2/3HL.P2.G11,16Ag,20 de rata (ATCC CRL 1662, de aquí en adelante referidas como "células YB2/0") y semejantes. En algunas formas de realización, se usa la célula YB2/0 dado que la actividad ADCC de las proteínas de unión quiméricas o humanizadas mejora cuando se expresa en esta célula.

La presente invención también abarca métodos para producir una célula huésped recombinante que expresa proteínas de unión, péptidos y fragmentos de los mismos, de la presente invención, donde dicho método comprende los pasos que consisten en (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector descritos precedentemente en una célula huésped competente, (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan dichas proteínas de unión, péptidos y fragmentos de las mismas. Dichas células huésped recombinantes se pueden usar en el método de diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico de la presente invención.

En otro aspecto, según se describió anteriormente, la presente invención provee ácidos nucleicos aislados que se hibridizan en condiciones de hibridación selectivas con un polinucleótido divulgado en la presente. Por consiguiente, los polinucleótidos de esta forma de realización se pueden usar para aislar, detectar y/o cuantificar los ácidos nucleicos que comprenden dichos polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para identificar, aislar o amplificar clones parciales o de longitud completa en una biblioteca depositada. En algunas formas de realización, los polinucleótidos son secuencias genómicas o de ADNc aisladas, o complementarias de otra manera con un ADNc de una biblioteca de ácidos nucleicos humana o de mamífero. En algunas formas de

realización, la biblioteca de ADNc comprende por lo menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o cualquier rango entre ellos, inclusive, tal como por lo menos aproximadamente 80%-100%, de secuencias de longitud completa. Las bibliotecas de ADNc se pueden normalizar para aumentar la representación de secuencias raras. Típicamente, pero no de manera exclusiva, se emplean condiciones de hibridación de severidad baja o moderada con las secuencias que presentan una identidad de secuencia reducida con relación a las secuencias complementarias. Opcionalmente, se pueden emplear condiciones de severidad moderada y alta para las secuencias de mayor identidad. Las condiciones de severidad baja permiten una hibridación selectiva de secuencias que presentan aproximadamente un 70% de identidad de secuencia y se pueden emplear para identificar secuencias ortólogas o parálogas. Opcionalmente, los polinucleótidos de la presente invención codificarán por lo menos una porción de una proteína de unión codificada por los polinucleótidos que se describen en la presente. Los polinucleótidos de la presente invención abarcan secuencias de ácidos nucleicos que se pueden emplear para una hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica una proteína de unión de la presente invención (véase, por ejemplo, Ausubel, supra y Colligan, supra).

VII. Células modificadas

En un aspecto abarcado por la presente invención, aquí se proveen células huésped que expresan proteínas que se describen en la presente, por ejemplo, péptidos inmunogénicos MAGEA1, complejos péptido MAGEA1-MHC (pMHC) inmunogénicos, proteínas de unión a MAGEA1 (por ejemplo, TCRs, fragmentos de unión a antígeno de TCR, CAR, o proteínas de fusión que comprenden un TCR y un dominio efector), y otros similares que se describen en la presente. En algunas formas de realización, las células huésped comprenden los ácidos nucleicos o los vectores que se describen en la presente.

En algunas formas de realización, se usa un polinucleótido que codifica una proteína de unión para transformar, transfectar o transducir una célula huésped (por ejemplo, una célula T) para su uso en una terapia de transferencia adoptiva. Los avances en la secuenciación de ácidos nucleicos y en particular la secuenciación de TCR ya fueron descritos (por ejemplo, Robins *y col.,* (2009) *Blvd.* 114: 4099; Robins *y col.,* (2010) *Sci. Translat. Med.* 2: 47ra64, Robins *y col.,* (2011) *J. Imm. Meth.*, y Warren *y col.,* (2011) *Genome Res.,* 21: 790) y se pueden emplear en

el transcurso de la práctica de las formas de realización de la presente invención. De manera similar, los métodos para transfectar o transducir células T con los ácidos nucleicos deseados son bien conocidos en el arte (por ejemplo, en la publicación de la Patente de los EEUU N°: US 2004/0087025) así como los procedimientos de transferencia adoptiva usando las células T de la especificidad de antígeno deseada (por ejemplo, Schmitt *y col.,* (2009) *Hum. Gen.* 20: 1240, Dossett *y col.,* (2009) *Mol. Ther.* 77: 742, Till *y col.,* (2008) *Blood* 772: 2261, Wang *y col.,* (2007) *Hum. Gene Ther.,* 18: 112, Kuball *y col.,* (2007) *Blood* 709: 2331, publicación de Patente de los EEUU N°: 2011/0243972, publicación de Patente de los EEUU N°: 2011/0189141, y Leen *y col.,* (2007) *Ann. Rev. Immunol.* 25: 243).

Se puede modificar cualquier célula inmunológica adecuada para que incluya un polinucleótido heterólogo de la presente invención, inclusive, por ejemplo, una célula T, una célula NK o una célula T-NK. En algunas formas de realización, la célula puede ser una célula primaria o una célula de una línea celular. En algunas formas de realización, una célula inmunológica modificada comprende una célula T $CD4^+$, una célula T $CD8^+$ o ambas. A los efectos de la presente, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivadas, por ejemplo, Jurkat, SupTl , *etc.*, o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, sangre, médula ósea, nódulo linfático, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden purificar o se pueden enriquecer las mismas. En algunas formas de realización, la célula T es una célula T humana. En algunas formas de realización, la célula T es una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede ser de cualquier etapa del desarrollo, inclusive, pero en un sentido no taxativo, un linfocito citotóxico, una célula precursora de un linfocito citotóxico, una célula progenitora de un linfocito citotóxico, células madre de linfocitos citotóxicos, células T doble positivas $CD4^+/CD8^+$, células T auxiliares $CD4^+$, por ejemplo, células Th1 y Th2, células T $CD4^+$, células T $CD8^+$ (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria centrales y células T de memoria centrales efectoras), células T naive y semejantes.

Se puede usar cualquier método apropiado para transfectar o transducir las células (por ejemplo, células T) o para administrar las secuencias de nucleótidos o las composiciones que

abarcan los métodos descritos en la presente. Los métodos para administrar polinucleótidos en las células huésped incluyen, por ejemplo, el uso de polímeros catiónicos, moléculas tipo lípido y algunos productos comerciales tal como, por ejemplo, in vivo-jetPEI®. Otros métodos incluyen transducción *ex vivo*, inyección, electroporación, DEAE-dextrano, carga por sonicación, transfección mediada por liposomas, transducción mediada por receptores, bombardeo de microproyectiles, transferencia mediada por transposones y semejantes. Aún otros métodos para transfectar o transducir células huésped emplean vectores, como se describe con mayor detalle en la presente.

Las células inmunológicas modificadas que se describen en la presente se pueden caracterizar funcionalmente usando metodologías para evaluar la actividad de las células T, e incluyen determinación de la unión, activación o inducción de células T y también incluyen la determinación de las respuestas de células T que son específicas del antígeno. Los ejemplos incluyen determinación de la proliferación de células T, la liberación de citoquinas por de células T, estimulación de células T específica del antígeno, estimulación de células T restringida por MHC, actividad CTL (por ejemplo, mediante detección de la liberación de ^{51}Cr a partir de células diana precargadas), cambios en la expresión de marcadores fenotípicos de células T y otras mediciones de las funciones de las células T.

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

En algunas formas de realización, la afinidad aparente por una proteína de unión, tal como un TCR o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede medir mediante evaluación de la unión a varias concentraciones de multímeros de MHC. La “tinción de multímeros de MHC-péptido” se refiere a un ensayo usado para detectar las células T específicas del antígeno, que, en algunas formas de realización, caracteriza un tetrámero de moléculas de MHC, cada uno de los cuales comprende un péptido idéntico que tiene una secuencia de aminoácidos que es cognada (por ejemplo, es idéntica o está relacionada) de por lo menos un antígeno (por ejemplo, un péptido inmunogénico MAGEA1), en donde el complejo se puede unir a una

proteína de unión, tal como un TCR o una porción de unión a antígeno del mismo, que reconoce al antígeno conocido. Cada una de las moléculas de MHC se puede marcar con una molécula de biotina. Los MHC/péptidos biotinilados se pueden multimerizar (por ejemplo, tetramerizar) mediante la adición de estreptavidina, que puede estar marcado con fluorescencia.

El multímero se puede detectar mediante citometría de flujo por medio de la marca fluorescente. En algunas formas de realización, se usa un ensayo de multímero de pMHC para detectar o seleccionar una proteína de unión de afinidad mejorada, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención. En algunos ejemplos, K_D aparente de una proteína de unión, tal como un TCR o porción de unión a antígeno del mismo, se mide usando diluciones 2X de multímeros marcados en un rango de concentraciones, seguido por determinación de las curvas de unión mediante regresión no lineal, donde K_D aparente se determina como la concentración de ligando que dio como resultado la unión medio máxima.

Los niveles de citoquinas se pueden determinar usando los métodos que se describen en la presente, tal como ELISA, ELISPOT, tinción intracelular de citoquinas y citometría de flujo y combinaciones de los mismos (por ejemplo, tinción intracelular citoquina y citometría de flujo).

La proliferación de células inmunológicas y la expansión clonal que es el resultado de la generación o estimulación específica del antígeno de una respuesta inmunológica se puede determinar mediante aislamiento de linfocitos, tales como linfocitos en la circulación en muestras de células de sangre periférica o de células de nódulo linfáticos, estimulación de las células con el antígeno y medición de la producción de citoquinas, proliferación celular y/o viabilidad celular, tal como mediante incorporación de timidina tritiada o ensayos no radioactivos, tales como ensayos MTT y semejantes. El efecto de un inmunógeno descrito en la presente sobre el equilibrio entre una respuesta inmunológica Thl y una respuesta inmunológica Th2 se puede examinar, por ejemplo, mediante determinación de los niveles de citoquinas Thl, tales como IFN-g, IL-12, IL-2 y TNF-b, y citoquinas Tipo 2, tales como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-l3.

Una célula huésped de la presente invención puede comprender un solo polinucleótido que codifica una proteína de unión descrita en la presente, o la proteína de unión puede estar codificada por más de un polinucleótido. En otras palabras, los componentes o las porciones

de una proteína de unión pueden estar codificados por dos o más polinucleótidos, que pueden estar contenidos en una sola molécula de ácido nucleico o pueden estar contenidos en dos o más moléculas de ácidos nucleicos.

Aún más, como se describirá también más adelante y en los ejemplos, una célula huésped comprendida por la presente invención puede codificar y/o expresar proteínas accesorias útiles además de una proteína de unión descrita en la presente, ya sea en el mismo polinucleótido o en un polinucleótido diferente como la proteína de unión o componentes de la misma. Por ejemplo, la célula huésped puede codificar y/o expresar CD8α, CD8β, un DN-TGFβR (por ejemplo, un DN-TGFβRII) y/o un marcador de proteínas seleccionable, opcionalmente en donde el marcador de proteínas seleccionable es DHFR.

En algunas formas de realización, un polinucleótido que codifica dos o más componentes o porciones de una proteína de unión de la presente invención comprende dichas dos o más secuencias codificantes asociadas operativamente en un solo marco de lectura abierto. Dicha disposición puede permitir ventajosamente una expresión coordinada de los productos genéticos deseados, tales como, por ejemplo, una expresión contemporánea de las cadenas alfa y beta de un TCR, de manera tal que se producen a una relación de 1:1 aproximadamente. En algunas formas de realización, dos o más productos genéticos sustituyentes de una proteína de unión de la presente invención, tal como un TCR (por ejemplo, las cadenas alfa y beta) o CAR, se expresan como moléculas separadas y se asocian después de la traducción. En formas de realización adicionales, dos o más productos genéticos sustituyentes de una proteína de unión de la presente invención se expresan como un solo péptido, donde las partes están separadas por un segmento escindible o removible. Por ejemplo, los péptidos autoescindibles que son de utilidad para la expresión de polipéptidos separables codificados por un solo polinucleótido o vector son conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, un péptido del tescovirus-1 2 A porcino (P2A), un péptido del virus thoseaasigna 2A (T2A), un péptido del virus de rinitis A equino (ERAV) 2A (E2A) y un péptido del virus de aftosa 2A (F2A).

En algunas formas de realización, una proteína de unión de la presente invención comprende uno o más aminoácidos de unión. Los “aminoácidos de unión” o “residuos de aminoácidos de unión” se refieren a uno o más (por ejemplo, entre 2 y aproximadamente 10) residuos de aminoácidos situados entre dos motivos, regiones o dominios adyacentes de un polipéptido,

tal como entre un dominio de unión y un dominio constante adyacente o entre una cadena de un TCR y un péptido autoescindible adyacente. Los aminoácidos de unión pueden ser el resultado del diseño de una construcción que codifica una proteína de fusión (por ejemplo, los residuos de aminoácidos que resultan del uso de un sitio de una enzima de restricción durante la construcción de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión), o de la escisión, por ejemplo, de un péptido autoescindible adyacente en uno o más dominios de una proteína de unión codificada de la presente invención (por ejemplo, un péptido P2A dispuesto entre una cadena alfa de un TCR y la cadena β de un TCR, cuya autoescisión puede dejar uno o más aminoácidos de unión en la cadena alfa, la cadena β de un TCR, o en ambas).

Las células inmunológicas modificadas de la presente invención se pueden administrar como terapias, por ejemplo, para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (tal como un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1). En algunas circunstancias, puede ser deseable reducir o detener la actividad asociada con una inmunoterapia celular. Por consiguiente, en algunas formas de realización, una célula inmunológica modificada de la presente invención comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína de unión y una proteína accesoria, tal como una proteína interruptora de seguridad, que se puede buscar como diana usando un fármaco cognado u otro compuesto para modular selectivamente la actividad (por ejemplo, disminuir o anular) de dichas células cuando fuera deseable. Las proteínas interruptoras de seguridad usadas de esta manera incluyen, por ejemplo, un polipéptido del receptor de EGF truncado (huEGFRt) que está desprovisto de dominios de unión a ligando N-terminales extracelulares y actividad tirosina quinasa del receptor intracelular pero retiene la secuencia de aminoácidos nativa, localización de la superficie celular transmembrana tipo I y un epítopo de unión conformacionalmente intacto para un anticuerpo monoclonal anti-EGFR de grado farmacéutico, cetuximab (Erbitux) receptor de tEGF (tEGFr; Wang *y col.,* (2011) *Blood* 118: 1255-1263), un polipéptido de caspasa (por ejemplo, iCasp9; Straathof *y col.,* (2005) *Blood* 105: 4247-4254, Di Stasi *y col.,* (2011) *N. Engl. J. Med.* 365: 1673-1683, Zhou y Brenner (2016) *Hematol.* pii: S0301-472X: 30513-30516), RQR8 (Philip *y col.,* (2014) *Blood* 124: 1277-1287) y una marca de la proteína c-myc humana (Kieback *y col.,* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 623-628).

Otros componentes accesorios que son útiles para las células terapéuticas comprenden una marca o un marcador de selección (por ejemplo, una marca de enriquecimiento de CD34) que permite identificar, clasificar, aislar, enriquecer o rastrear las células. Por ejemplo, las células inmunológicas marcadas que tienen las características deseadas (por ejemplo, un TCR específico del antígeno y una proteína interruptora de seguridad) se pueden separar de las células no marcadas en una muestra y activar y expandir de manera más eficiente para su inclusión en un producto terapéutico de la pureza deseada.

Tal como se usa en la presente, el término “marcador de selección" comprende una construcción de ácidos nucleicos que confiere un cambio identificable a una célula que permite la detección y selección positiva de las células inmunológicas transducidas con un polinucleótido que comprende un marcador de selección. Por ejemplo, RQR es un marcador de selección que comprende un bucle mayor extracelular de CD20 y dos sitios de unión de CD34 mínimos. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica RQR comprende un polinucleótido que codifica el epítopo mínimo de CD34 de 16 aminoácidos. En algunas formas de realización, tal como determinadas formas de realización provistas en los ejemplos en la presente, el epítopo mínimo de CD34 se incorpora en la posición amino terminal del dominio de tallo de CD8 (Q8). En formas de realización adicionales, la secuencia del sitio de unión mínimo de CD34 se puede combinar con un epítopo diana para que CD20 forme un gen marcador/suicida compacto para células T (RQR8) (Philip *y col.,* 2014). Esta construcción permite seleccionar las células inmunológicas que expresan la construcción, donde por ejemplo, el anticuerpo específico de CD34 está unido a esferas magnéticas (Miltenyi) y que utilizan el anticuerpo farmacéutico clínicamente aceptado, rituximab, que permite la supresión selectiva de un transgen que expresa una célula T modificada (por ejemplo, Philip *y col.,* (2014) *Blood* 124: 1277-1287, publicación de Patente de los EEUU N°: 2015-0093401, y publicación de Patente de los EEUU N°: 2018-0051089).

Otros ejemplos de marcadores de selección incluyen varias proteínas transmembrana tipo I truncadas que normalmente no son expresadas sobre las células T: el factor de crecimiento de nervios de baja afinidad truncada, CD19 truncado y CD34 truncado (por ejemplo, Di Stasi *y col.,* (2011) *N. Engl. J. Med.* 365: 1673-1683, Mavilio *y col.,* (1994) *Blood* 83: 1988-1997, y Fehse *y col.,* (2000) *Mol. Ther.* 7: 448-456). Un rasgo particularmente atractivo de CD19 y CD34 es la disponibilidad del sistema de selección de disponibilidad inmediata Miltenyi

CliniMACs™ que puede buscar como diana a estos marcadores para una clasificación de grado clínico. Sin embargo, CD19 y CD34 son proteínas de superficie relativamente grandes que pueden poner a prueba la capacidad de empaquetamiento del vector y la eficacia de transcripción de un vector de integración. También se pueden emplear marcadores de superficie que contienen dominios de no señalización, extracelulares, o varias proteínas (por ejemplo, CD19, CD34, LNGFR, etc.). Se puede emplear cualquier marcador de selección y debería ser aceptable para buenas prácticas de fabricación. En algunas formas de realización, los marcadores de selección se expresan con un polinucleótido que codifica un producto genético de interés (por ejemplo, una proteína de unión abarcada por la presente invención, tal como un TCR o CAR, o un fragmento de unión a antígeno del mismo). Otros ejemplos de marcadores de selección incluyen, por ejemplo, informantes tales como GFP, EGFP, β-gal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). En algunas formas de realización, un marcador de selección, tal como, por ejemplo, CD34, es expresado por una célula y dicho CD34 se puede usar para seleccionar, enriquecer o aislar (por ejemplo, mediante selección inmunomagnética) las células de interés transducidas para su uso en los métodos que se describen en la presente. Tal como se usa en la presente, un marcador CD34 se distingue de un anticuerpo anti-CD34 o, por ejemplo, un scFv, TCR, u otra unidad de reconocimiento del antígeno que se une a CD34.

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

A modo de antecedente, la inclusión de células T $CD4^+$ en un producto celular para una inmunoterapia puede proveer una secreción de IL-2 inducida por el antígeno y aumentar la persistencia y función de las células T $CD8^+$ citotóxicas transferidas (por ejemplo, Kennedy *y col.,* (2008) *Immunol. Rev.* 222: 129 y Nakanishi *y col., Nature* (2009) 52: 510). En algunas formas de realización, un TCR restringido clase I en las células T $CD4^+$ puede requerir la transferencia de un correceptor CD8 para mejorar la sensibilidad del TCR a los complejos de péptido HLA clase I. Los correceptores CD4 difieren en cuanto a su estructura de CD8 y no pueden sustituir eficazmente los correceptores CD8 (por ejemplo, Stone & Kranz (2013) *Front. Immunol.* 4: 244 y Cole *y col.,* (2012) *Immunology* 737: 139). Por consiguiente, otra proteína accesoria que se puede usar en las composiciones y los métodos de la presente invención

comprende un correceptor CD8 o un componente del mismo. Las células inmunológicas modificadas que comprenden un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína de unión abarcada por la presente invención pueden comprender además, en algunas formas de realización, un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína correceptora CD8, o un componente de una cadena beta o una cadena alfa de la misma.

Una célula huésped se puede transducir eficazmente para que contenga, y para que pueda expresar eficazmente, un solo polinucleótido que codifica la proteína de unión, la proteína interruptora de seguridad, el marcador de selección y la proteína correceptora CD8.

En una forma de realización, la célula huésped de la presente invención incluye además un ácido nucleico que codifica una molécula coestimulante, de manera tal que la célula T modificada expresará dicha molécula coestimulante. En algunas formas de realización, el dominio coestimulante se selecciona entre CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BB, 4-1BBL, PD1 y PD1L.

En cualquiera de las formas de realización precedentes, la célula huésped que expresa la proteína de unión descrita en la presente puede ser una célula inmunológica universal. Una “célula inmunológica universal” comprende una célula inmunológica que ha sido modificada para reducir o eliminar la expresión de uno o más genes endógenos que codifican un producto polipeptídico seleccionado entre PD-l, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT, una molécula HLA, una molécula TCR o cualquier combinación de las mismas. Sin limitaciones por la teoría, algunas proteínas de la célula inmunológica expresadas de manera endógena pueden disminuir la expresión de la actividad inmunológica de las células inmunológicas modificadas (por ejemplo, PD-l, LAG-3, CTLA4, TIGIT), o pueden interferir con la actividad de unión de una proteína de unión de la presente invención expresada de manera heteróloga (por ejemplo, un TCR endógeno que se une a un antígeno no MAGEA1 e interfiere con la unión de la célula inmunológica modificada a una célula diana que expresa un antígeno MAGEA1, tal como un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula del MHC. Además, las proteínas endógenas (por ejemplo, proteínas de células inmunológicas, tal como un alelo de HLA) expresadas sobre una célula inmunológica donante pueden ser reconocidas como foráneas por un huésped alogénico, lo cual puede dar como resultado la eliminación o supresión de la célula inmunológica modificada donante por el huésped alogénico.

Por lo tanto, la disminución o eliminación de la expresión o actividad de dichos genes o

proteínas endógenos puede mejorar la actividad, tolerancia o persistencia de las células inmunológicas modificadas en el entorno de un huésped autólogo o alogénico, y permite una administración universal de las células (por ejemplo, a cualquier receptor independientemente del tipo de HLA). En algunas formas de realización, las células de acuerdo con la presente invención son singénicas, lo cual significa que son genéticamente idénticas o suficientemente idénticas e inmunológicamente compatibles como para permitir un trasplante. En algunas formas de realización, una célula inmunológica universal es una célula donante (por ejemplo, alogénica) o una célula autóloga. En algunas formas de realización, una célula inmunológica modificada (por ejemplo, una célula inmunológica universal) abarcada por la presente invención comprende el noqueo de un gen cromosómico de uno o más entre un gen que codifica PD-l, LAG-3, CTLA4, TIM3, TIGIT u otro punto de control inmunológico, un componente de HLA (por ejemplo, un gen que codifica una macroglobulina αl, una macroglobulina α2, una macroglobulina α3, una microglobulina β1 o una microglobulina β2) o un componente de un TCR (por ejemplo, un gen que codifica una región variable de un TCR o una región constante de un TCR) (véase, por ejemplo, Torikai *el al.,* (2016) *Nature Sci. Rep.* 6: 21757; Torikai *et al.,* (2012) *Blood* 179: 5697; y Torikai *et al.,* (2013) *Blood* 722: 1341, que también proveen ejemplos de técnicas de edición de genes, composiciones y terapias de células adoptivas representativas que son de utilidad de acuerdo con la presente invención).

Tal como se usa en la presente, el término “noqueo de un gen cromosómico” se refiere a una alteración genética o a un agente inhibidor introducido en una célula huésped que previene (por ejemplo, reduce, retarda, suprime o anula) la producción, por la célula huésped, de un producto polipeptídico endógeno funcionalmente activo. Las alteraciones que dan como resultado el noqueo de un gen cromosómico pueden incluir, por ejemplo, la introducción de mutaciones sin sentido (inclusive la formación de codones de terminación prematura), mutaciones de sentido erróneo, supresión de genes y rupturas de hebras, así como la expresión heteróloga de moléculas de ácidos nucleicos inhibidoras que inhiben la expresión de genes endógenos en la célula huésped.

En algunas formas de realización, un noqueo de genes o *knock-in* de genes cromosómicos se puede efectuar mediante edición cromosómica de una célula huésped. La edición cromosómica se puede realizar usando, por ejemplo, endonucleasas. Tal como se usa en la presente, una “endonucleasa” se refiere a una enzima capaz de catalizar la escisión de un

enlace fosfodiéster en una cadena de polinucleótidos. En algunas formas de realización, una endonucleasa puede escindir un gen buscado para de esa manea inactivar o “noquear” dicho gen buscado. Una endonucleasa puede ser una endonucleasa natural, recombinante, modificada genéticamente o de fusión. Las rupturas causadas por la endonucleasa en la hebra de ácido nucleico se reparan comúnmente por medio de distintos mecanismos de recombinación homóloga o de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Durante una recombinación homóloga, se puede usar una molécula de ácido nucleico donante para el "*knock-in*" de un gen donante, para el "noqueo" de un gen diana, y opcionalmente para inactivar un gen diana por medio de un evento de *knock in* de genes o noqueo de un gen diana. La NHEJ es un proceso de reparación sujeta a error que a menudo da como resultado cambios en la secuencia de ADN en el sitio de la escisión, por ejemplo, una sustitución, supresión o adición de por lo menos un nucleótido. Se puede usar NHEJ para “noquear” un gen diana. Los ejemplos de endonucleasas incluyen nucleasas con dedo de zinc, nucleasas TALE, nucleasas CRISPR-Cas, meganucleasas y megaTAL.

Tal como se usa en la presente, una “nucleasa con dedo de zinc” (ZFN) se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN con dedo de zinc fusionado a un dominio de escisión de ADN no específico, tal como una endonucleasa FokI. Cada motivo de dedo de zinc de aproximadamente 30 aminoácidos se une a aproximadamente 3 pares de bases de ADN, y los aminoácidos en algunos residuos se pueden cambiar para alterar la especificidad de la secuencia del triplete (por ejemplo, Desjarlais *y col.,* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2256-2260 y Wolfe *y col.,* (1999) J. *Mol. Biol.* 255: 1917-1934). Se pueden ligar múltiples motivos de dedo de zinc en tándem a fin de crear una especificidad de unión a las secuencias de ADN deseadas, tales como regiones que tienen una longitud que varía en un rango entre aproximadamente 9 y aproximadamente 18 pares de bases. A modo de antecedente, los ZFN median la edición del genoma catalizando la formación de una ruptura de la hebra doble del ADN (DSB) específico del sitio en el genoma, y la integración dirigida de un transgen que comprende secuencias flanqueadoras homólogas del genoma en el sitio de DSB es facilitada por una reparación dirigida por homología. Como alternativa, una DSB generada por un ZFN puede dar como resultado el noqueo de un gen diana por medio de reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es una vía de reparación celular sujeta a error que da como resultado la inserción o supresión de nucleótidos en el sitio

de escisión. En algunas formas de realización, un noqueo de genes comprende una inserción, una supresión, una mutación o una combinación de las mismas, realizada usando una molécula ZFN.

Tal como se usa en la presente, una “nucleasa efectora tipo activadora de la transcripción” (TALEN) se refiere a una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a ADN TALE y un dominio de escisión de ADN, tal como una endonucleasa FokI. Un “dominio de unión a ADN TALE” o “TALE” está compuesto por uno o más dominios/unidades de repetición TALE, cada uno de los cuales en general tiene una secuencia de 33-35 aminoácidos altamente conservada excepto por los aminoácidos 12 y 13 que son divergentes. Los dominios de repetición TALE están involucrados en la unión de TALE a una secuencia de ADN diana. Los residuos de aminoácidos divergentes, denominados dirresiduos de repetición variable (RVD), se correlacionan con un reconocimiento de nucleótidos específico. Se ha determinado el código natural (canónico) para el reconocimiento de ADN de estos TALE de manera tal que una secuencia HD (histidina-ácido aspártico) en las posiciones 12 y 13 del TALE conduce a la unión de TALE a citosina (C), NG (asparagina-glicina) se une a un nucleótido T, NI (asparagina-isoleucina) a A, NN (asparagina-asparagina) se une a un nucleótido G o A, y NG (asparagina-glicina) se une a un nucleótido T. Los RVD no canónicos (atípicos) también son bien conocidos en el arte (por ejemplo, la publicación de Patente de los EEUU N°: US 2011/0301073, cuyos RVD atípicos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia). Se pueden usar TALEN para dirigir rupturas de la hebra doble específicas del sitio (DSB) en el genoma de células T. La unión de extremos no homólogos (NHEJ) une el ADN de ambos lados de una ruptura de hebra doble en donde hay poca o ninguna superposición de secuencias para el alineamiento, introduciendo de esa manera errores que noquean la expresión del gen. Como alternativa, una reparación dirigida por homología puede introducir un transgen en el sitio de la DSB siempre que haya secuencias flanqueadoras homólogas en el transgen. En algunas formas de realización, un noqueo de genes comprende una inserción, una supresión, una mutación o una combinación de las mismas, y se realiza usando una molécula TALEN.

Tal como se usa en la presente, un sistema de nucleasas de “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas/Cas” (CRISPR/Cas) se refiere a un sistema que emplea una nucleasa Cas guiada por CRISPR ARN (ARNcr) para reconocer sitios diana en un

genoma (conocida como protoespaciadores) por medio de complementariedad de apareamiento de bases y para luego escindir el ADN si hay un motivo asociado al protoespaciador conservado, corto, inmediatamente después del extremo 3' terminal de la secuencia diana complementaria. Los sistemas CRISPR/Cas se clasifican en tres tipos (es decir, tipo I, tipo II y tipo III) basado en la secuencia y estructura de las nucleasas Cas. Los complejos de vigilancia guiados por ARNcr en los tipos I y III necesitan múltiples subunidades Cas. El sistema Tipo II, el más estudiado, comprende por lo menos tres componentes: una nucleasa Cas9 guiada por ARN, un ARNcr y un ARNcr que actúa en trans (ARNtracr). El ARNtracr comprende una región formadora de dúplex. Un ARNcr y un ARNtracr forman un dúplex que tiene la capacidad para interactuar con una nucleasa Cas9 y guiar el complejo Cas9/ARNcr:ARNtracr hacia un sitio específico en el ADN diana por medio de apareamiento de bases de Watson-Crick entre el espaciador en el ARNcr y el protoespaciador en el ADN diana corriente arriba con respecto a un PAM. La nucleasa Cas9 escinde una ruptura de hebra doble dentro de una región definida por el espaciador ARNcr. La reparación con NHEJ da como resultado inserciones y/o supresiones que interrumpen la expresión del locus diana. Como alternativa, se puede introducir un transgen con secuencias flanqueadoras homólogas en el sitio de DSB por medio de una reparación dirigida por homología. El ARNcr y el ARNtracr se pueden manipular para formar un ARN guía simple (ARNgs o ARNg) (por ejemplo, Jinek *y col.,* (2012) *Science* 337: 816-821). Además, se puede alterar o programar la región del ARN guía complementario del sitio diana para dirigirla a una secuencia deseada (Xie *y col.,* (2014) *PLOS One* 9: el00448, publicación de Patente de los EEUU Nº: US 2014/0068797, publicación de Patente de los EEUU Nº: US 2014/0186843, Patente de los EEUU N°: 8.697.359 y publicación PCT Nº: WO 2015/071474). En algunas formas de realización, un noqueo de genes comprende una inserción, una supresión, una mutación o una combinación de las mismas, y se realiza usando un sistema de nucleasas CRISPR/Cas.

Los ejemplos de secuencias de ARNg y de métodos para usar las mismas para noquear genes endógenos que codifican proteínas de células inmunológicas incluyen las que se describe en Ren *y col.,* (2017) *Clin. Cancer Res.,* 23: 2255-2266, que provee ejemplos de ARNg, ADN CAS9, vectores y técnicas de noqueo de genes que son representativos.

Tal como se usa en la presente, una "meganucleasa", también conocida como "endonucleasa dirigida [*homing*]", se refiere a una endodesoxirribonucleasa caracterizada por un sitio de

reconocimiento grande (secuencias de ADN de hebra doble de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 40 pares de bases). Las meganucleasas se pueden dividir en cinco familias en base a la secuencia y motivos de estructura: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, motivo His-Cys y PD-(D/E)XK. Los ejemplos de meganucleasas incluyen I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, RI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII y I-TevIII, cuyas secuencias de reconocimiento son bien conocidas (por ejemplo, las Patentes de los EEUU N°: 5.420.032 y 6.833.252, Belfort *y col.,* (1997) *Nucl. Acids Res.,* 25: 3379-3388, Dujon *y col.,* (1989) *Gene* 52: 115-118, Perler *y col.,* (1994) *Nucl. Acids Res.,* 22: 1125-1127, Jasin (1996) *Trends Genet.,* 72: 224-228, Gimble *y col.,* (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 163-180, y Argast *y col.,* (1998) *J. Mol. Biol.* 280: 345-353).

En algunas formas de realización, las meganucleasas naturales se pueden usar para promover una modificación del genoma específica del sitio de una diana de interés, tal como un punto de control inmunológico, un gen que codifica HLA o un gen que codifica un componente de un TCR.

En otras formas de realización, se usa una meganucleasa modificada que presenta una nueva especificidad de unión por un gen diana para realizar una modificación del genoma específica del sitio (véase, por ejemplo, Porteus *y col.,* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23: 967-73, Sussman *y col.,* (2004) *J. Mol. Biol.* 342: 31-41, Epinat *y col.,* (2003) *Nucl. Acids Res.,* 37: 2952-2962, Chevalier *y col.,* (2002) *Mol. Cell* 70: 895-905, Ashworth *y col.,* (2006) *Nature* 441: 656-659, Paques *y col.,* (2007) *Curr. Gene Ther.,* 7: 49-66, y las publicaciones de Patentes de los EEUU N°: US 2007/0117128, US 2006/0206949, US 2006/0153826, US 2006/0078552 y US 2004/0002092). En formas de realización adicionales, se genera un noqueo de un gen cromosómico usando una endonucleasa dirigida que ha sido modificada con dominios de unión de ADN modulares de TALEN para obtener una proteína de fusión conocida como megaTAL. Las MegaTAL no solo se pueden utilizar para noquear uno o más genes diana, sino también para introducir (*knock in*) polinucleótidos heterólogos o exógenos cuando se usan en combinación con un molde donante exógeno que codifica un polipéptido de interés.

En algunas formas de realización, un noqueo de un gen cromosómico comprende una molécula de ácido nucleico inhibidora que se introduce en una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica) que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un receptor específico del antígeno que se une (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva)

a un antígeno MAGEA1, en donde dicha molécula de ácido nucleico inhibidora codifica un inhibidor específico de la diana y en donde el inhibidor específico de la diana codificado inhibe la expresión de un gen endógeno (es decir, de PD-l, TIM3, LAG3, CTLA4, TIGIT, un componente de HLA o un componente de TCR, o cualquier combinación de los mismos) en la célula huésped inmunológica.

El noqueo de un gen cromosómico se puede confirmar de manera directa mediante secuenciación de ADN de la célula huésped inmunológica después de usar el procedimiento o agente de noqueo.

Los noqueos de un gen cromosómico también se pueden inferir a partir de la ausencia de expresión del gen (por ejemplo, ausencia de un ARNm o de un producto polipeptídico codificado por el gen) después del noqueo.

En algunas formas de realización, una célula huésped de la presente invención es capaz de matar de manera específica y/o selectiva al 50 % o más de las células diana que comprenden un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC.

En algunas formas de realización, la célula inmunológica modificada puede producir una citoquina cuando se pone en contacto con células diana que comprenden un complejo de péptido-MHC (pMHC) que comprende un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC.

En algunas formas de realización, la citoquina comprende IFN-γ o IL2. En algunas formas de realización, la citoquina comprende TNF-α.

En algunas formas de realización, la célula huésped puede producir un nivel mayor de citoquinas o de una molécula citotóxica cuando se pone en contacto con una célula diana que presenta expresión de MAGEA1 a un nivel menor o igual a aproximadamente 1.000 transcriptos por millón de transcriptos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM y 1

TPM, o cualquier rango comprendido entre estos valores, inclusive, tal como menor o igual a aproximadamente 1.000 TPM a menos o igual a aproximadamente 35 TPM). En algunas formas de realización, el bajo nivel de expresión de MAGEA1 se denomina "expresión heterocigota" lo cual equivale a entre aproximadamente 1 TPM y aproximadamente 35 TPM, o cualquier rango entre estos valores, inclusive, tal como 1-32 TPM. Por ejemplo, la célula huésped tiene la capacidad para producir un nivel de citoquinas o de una molécula citotóxica que es por lo menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces o más, o cualquier rango comprendido entre estos valores, inclusive, tal como entre 1,2 veces y 2 veces más alto.

En algunas formas de realización, la célula huésped tiene la capacidad para matar de manera específica y/o selectiva una célula diana que expresa MAGEA1 (por ejemplo, una célula hiperproliferativa que expresa MAGEA1). En determinadas formas de realización, la célula diana expresa un péptido inmunogénico MAGEA1 en el contexto de una molécula de MHC (por ejemplo, una molécula de MHC adaptada). En determinadas formas de realización, la célula diana expresa: (i) un polipéptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1; y (ii) una molécula de MHC coincidente.

En algunas formas de realización, las células huésped no expresan un antígeno MAGEA1, no son reconocidas por una proteína de unión descrita en la presente, no son del serotipo HLA-A*01 y/o no expresan un alelo HLA-A*01, tales como los alelos HLA-A*01:01. Por ejemplo, un paciente puede recibir células huésped de un donante sano que es MAGEA1-negativo o HLA-A*01:01-negativo, o aún células autólogas que han sido seleccionadas y/o modificadas. Se pueden usar células, tales como células madre como células madre hematopoyéticas, aisladas de dicho donante (o células autólogas modificadas) como fuente del material de transplante. En paralelo, las células T aisladas del mismo donante se pueden modificar genéticamente para que reconozcan al MAGEA1, tal como mediante expresión de una proteína de unión MAGEA1 descrita en la presente. Las células donantes, tales como células madre, se pueden usar para injertar poblaciones de células en el paciente (por ejemplo,

células madre hematopoyéticas usadas para reconstituir el sistema inmunológico) y las células huésped se pueden infundir en el paciente con la finalidad de generar un efecto antitumoral altamente específico. Las células T donantes modificadas se pueden diseñar para que reconozcan y eliminan las células que expresan MAGEA1, tal como todas las células sanguíneas nativas del paciente, que incluyen, por ejemplo, células de leucemia residuales tipo células cancerosas, que son MAGEA1-positivas, para de esa manera prevenir una recaída y promover curas completas. Dado que las nuevas células sanguíneas sanas del paciente derivan del donante y que por ello son ya sea MAGEA1-negativas, negativas para el serotipo HLA-A*01 y/o negativas para el alelo HLA-A*01 (por ejemplo., negativas para el alelo HLA-A*01:01), las células modificadas que se describen en la presente pueden presentar efectos secundarios tóxicos mínimos. Dichas células huésped adaptadas del paciente y los métodos de tratamiento se pueden usar de acuerdo con los métodos terapéuticos que se describirán más adelante.

En algunas formas de realización, la muerte se determina mediante un ensayo de muerte celular. En alguna forma de realización, el ensayo de muerte celular se lleva a cabo mediante cocultivo de la célula huésped y la célula diana a una relación de entre 20:1 y 0,625:1, por ejemplo, entre 15:1 y 1,25:1, entre 10:1 y 1,5:1, entre 8:1 y 3:1, entre 6:1 y 5:1, entre 20:1 y 5:1, entre 10:1 y 2,5:1 etc. En algunas formas de realización, la célula diana es pulsada con entre 1 µg/ml y 50 pg/ml del péptido MAGEA1, por ejemplo, entre 1 ug/ml y 10 ng/ml, entre 500 ng/ml y 0,5 ng/ml, entre 10 ng/ml y 10 pg/ml, entre 250 ng/ml y 1 ng/ml, entre 50 ng/ml y 5 ng/ml, entre 20 ng/ml y 10 ng/ml, etc.

En algunas formas de realización, la célula huésped tiene la capacidad para matar un mayor número de células diana cuando se pone en contacto con células diana que tienen un nivel de MAGEA1 menor o igual a aproximadamente 1.000 transcriptos por millón de transcriptos (TPM), 950 TPM, 900 TPM, 850 TPM, 800 TPM, 750 TPM, 700 TPM, 650 TPM, 600 TPM, 550 TPM, 500 TPM, 450 TPM, 400 TPM, 350 TPM, 300 TPM, 250 TPM, 200 TPM, 150 TPM, 100 TPM, 95 TPM, 90 TPM, 85 TPM, 80 TPM, 75 TPM, 70 TPM, 65 TPM, 60 TPM, 55 TPM, 50 TPM, 45 TPM, 40 TPM, 35 TPM, 34 TPM, 33 TPM, 32 TPM, 31 TPM, 30 TPM, 29 TPM, 28 TPM, 27 TPM, 26 TPM, 25 TPM, 24 TPM, 23 TPM, 22 TPM, 21 TPM, 20 TPM, 19 TPM, 18 TPM, 17 TPM, 16 TPM, 15 TPM, 14 TPM, 13 TPM, 12 TPM, 11 TPM, 10 TPM, 9 TPM, 8 TPM, 7 TPM, 6 TPM, 5 TPM, 4 TPM, 3 TPM, 2 TPM y 1 TPM, o cualquier rango comprendido entre

estos valores, inclusive, tal como menor o igual a entre aproximadamente 1.000 TPM y menor o igual a aproximadamente 35 TPM). En algunas formas de realización, el bajo nivel de expresión de MAGEA1 se denomina "expresión heterocigota" lo cual equivale a entre aproximadamente 1 TPM y aproximadamente 35 TPM, o cualquier rango entre estos valores, inclusive, tal como 1-32 TPM. Por ejemplo, la célula huésped puede matar por lo menos 1,2 veces, 1,5 veces, 1,8 veces, 2,0 veces, 2,2 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 8,5 veces, 9 veces, 9,5 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1000 veces o más, o cualquier rango comprendido entre estos valores, inclusive, tal como entre 1,2 veces y 2 veces, más células diana.

La presente invención provee además una población de células que comprende por lo menos una célula huésped descrita en la presente. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende cualquiera entre los vectores de expresión recombinantes descritos, además de por lo menos una célula adicional, por ejemplo, una célula huésped (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, células epiteliales, una célula muscular, una célula de cerebro, *etc.* Como alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en donde dicha población comprende fundamentalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población de células clonales, en donde todas las células de la población son clones de una sola célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de manera tal que todas las células de la población comprenden dicho vector de expresión recombinante. En una forma de realización de la presente invención, la población de células es una población clonal que comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante descrito en la presente.

En una forma de realización de la presente invención, se puede expandir rápidamente la cantidad de células en la población. La expansión de la cantidad de células T se puede llevar

a cabo mediante cualquiera de numerosos métodos que son bien conocidos en el arte (por ejemplo, las Patentes de los EEUU N°: 8.034.334 y 8.383.099, la publicación de Patente de los EEUU Nº: 2012/0244133, Dudley *y col.,* (2003) *J. Immunother*. 26: 332-242, y Riddell *y col.,* (1990) *J. Immunol. Methods* 128: 189-201). Por ejemplo, la expansión de la cantidad de células T se puede llevar a cabo mediante cultivo de las células T con el anticuerpo OKT3, IL-2 y PBMC alimentadoras (por ejemplo, PBMC alogénicas irradiadas).

VIII. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto incluido en la presente invención, aquí se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones que se describen en la presente (por ejemplo, proteínas de unión, ácidos nucleicos, células y semejantes) y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a aquellos agentes, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son apropiados para utilizar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una toxicidad, una irritación o una respuesta alérgica excesiva, y sin otros problemas o complicaciones, de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

Los agentes y otras composiciones de la presente invención se pueden formular especialmente para una administración en una forma sólida o líquida, inclusive aquellas adaptadas para varias rutas de administración, tales como (1) una administración oral, por ejemplo, suspensiones orales (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, bolos, polvos, gránulos, pastas; (2) una administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa tal como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril; (3) una aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento o aerosol aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; o (5) un aerosol, por ejemplo, como un aerosol acuoso, una preparación liposómica o partículas sólidas que contienen al compuesto. Se contempla cualquier forma apropiada de un agente o composición que se describe en la presente, tal como, pero en un sentido no taxativo, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas.

Las composiciones farmacéuticas abarcadas por la presente invención se pueden presentar como formas de dosificación discretas, tales como cápsulas, sachéts o comprimidos, o como

líquidos o rociados en aerosol cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un ingrediente activo como un polvo o en gránulos, una solución, o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión de aceite-en-agua, una emulsión líquida de agua-en-aceite, polvos para reconstituir, polvos para consumo oral, botellas (que incluyen polvos o líquidos en una botella), películas de disolución oral, pastillas, pastas, tubos, gomas y envases. Dichas formas de dosificación se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos de farmacia.

Los excipientes adecuados incluyen agua, salina, dextrosa, glicerol o semejantes y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, las composiciones que comprenden las células huésped, proteínas de unión o proteínas de fusión que se divulgan en la presente comprenden además un medio de infusión adecuado. Los medios de infusión adecuados pueden comprender cualquier formulación de un medio isotónico, típicamente salina normal, Normosol™ R (Abbott) o Plasma-Lyte™ A (Baxter), también se puede utilizar dextrosa al 5% en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede suplementar con albúmina de suero humano u otros componentes del suero humano. También se contemplan dosis unitarias que comprenden una cantidad eficaz de una célula huésped o de una composición.

En la presente también se proveen dosis unitarias que comprenden una cantidad eficaz de una célula huésped o de una composición que comprende la célula huésped. Tal como se describe en la presente, las células huésped incluyen células inmunológicas, células T (células T $CD4^+$ y/o células T CD8+), linfocitos citotóxicos (por ejemplo, células T citotóxicas y/o células asesinas naturales (NK)) y semejantes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una dosis unitaria comprende una composición que comprende por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%), por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, o por lo menos aproximadamente 95% de células modificadas, ya sea solas o en combinación con otras células, tal como que comprenden por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%), por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos

aproximadamente 90% o por lo menos aproximadamente 95% de otras células. En algunas formas de realización, hay una cantidad reducida o sustancialmente ninguna célula no deseada, tal como menos que aproximadamente 50%, menos que aproximadamente 40%, menos que aproximadamente 30%, menos que aproximadamente 20%, menos que aproximadamente 10%, menos que aproximadamente 5% o menos que aproximadamente 1% de la población de células en la composición.

La cantidad de células en la composición o dosis unitaria comprende por lo menos una célula (por ejemplo, por lo menos una célula T $CD8^+$ modificada, una célula T $CD4^+$ modificada y/o una célula NK) o más típicamente la cantidad es mayor que 10^2 células, por ejemplo, hasta 10^6, hasta 10^7, hasta 10^8 células, hasta 10^9 células o más de 10^{10} células. En algunas formas de realización, la células se administran en un rango entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{10} células/m^2, tal como en un rango entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^9 células/m^2. El número de células dependerá del uso final pretendido de la composición así como del tipo de células incluidas en la misma. Por ejemplo, las células modificadas para contener una proteína de unión específica de un antígeno particular comprenderá una población de células que contiene por lo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de dichas células. Para los usos provistos en la presente, las células en general se encuentran en un volumen de un litro o menos, 500 ml o menos, 250 ml o menos o 100 ml o menos. En algunas formas de realización, la densidad de las células deseadas típicamente es mayor que 10^4 células/ml y en general es mayor que 10^7 células/ml, generalmente 10^8 células/ml o mayor. Las células se pueden administrar como una sola infusión o en múltiples infusiones sobre un rango de tiempo. El número clínicamente relevante de células inmunológicas se puede distribuir en múltiples infusiones que acumuladas son iguales o exceden 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} o 10^{11} células. En algunas formas de realización, una dosis unitaria de las células inmunológicas modificadas se puede coadministrar (por ejemplo, de manera simultánea o contemporánea) con células madre hematopoyéticas de un donante alogénico.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad o condición a tratar (o prevenir) determinada por los expertos en el arte de la medicina. La dosis apropiada y la duración y frecuencia de administración adecuadas de las composiciones se determinarán mediante factores tales como el estado de salud del paciente,

el tamaño del paciente (es decir, peso, masa o área corporal), el tipo y la severidad de la condición del paciente, la forma particular del ingrediente activo y el método de administración. En general, la dosis y el régimen de tratamiento apropiados proveen la(s) composición(es) en una cantidad suficiente como para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico (tal como se describe en la presente, que incluye un resultado clínico mejorado, tales como remisiones completas o parciales más frecuentes, o una supervivencia sin enfermedad y/o global más prolongada o una disminución de la severidad de los síntomas).

Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica se refiere a una cantidad suficiente, a dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios, para alcanzar los resultados clínicos deseados o un tratamiento beneficioso, como se describe en la presente. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Si la administración es a un sujeto que ya se sabe o que se ha confirmado que padece una enfermedad o un estado de enfermedad, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se puede usar con referencia al tratamiento, en tanto una “cantidad profilácticamente eficaz” se puede usar para describir la administración de una cantidad eficaz a un sujeto que es susceptible o que tiene el riesgo de desarrollar una enfermedad o estado de enfermedad (por ejemplo, una recurrencia) como un curso preventivo.

Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o de múltiples dosis, tal como en ampollas o viales sellados. Dichos recipientes se pueden congelar para preservar la estabilidad de la formulación hasta el momento de su infusión en el paciente. En algunas formas de realización, una dosis unitaria comprende una célula huésped descrita en la presente a una dosis de entre aproximadamente 10^7 células/m^2 y aproximadamente 10^{11} células/m^2. El desarrollo de los regímenes adecuados de dosificación y tratamiento para usar las composiciones particulares que se describen en la presente en una variedad de regímenes de tratamiento, que incluyen, por ejemplo, una administración o formulación parenteral o intravenosa.

Si la presente composición se administra por vía parenteral, la composición también puede incluir una solución o suspensión acuosa u oleaginosa estéril. Los diluyentes o solventes no tóxicos parenteralmente aceptables adecuados incluyen agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, 1,3-butandiol, etanol, propilenglicol o polietilenglicoles en mezclas con agua.

Las soluciones o suspensiones acuosas pueden comprender además uno o más agentes amortiguadores, tales como acetato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio o tartrato de sodio. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier formulación de una unidad de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida. Una forma de dosificación unitaria, tal como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; en donde cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de células inmunológicas modificadas o del compuesto activo que se calcula para producir el efecto deseado en asociación con un vehículo farmacéutico apropiado.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica descrita en la presente y como se describió precedentemente para las composiciones inmunogénicas ejemplificadas de manera representativa para péptidos, cuando se administra a un sujeto, puede generar una respuesta inmunológica contra una célula de interés que expresa MAGEA1. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser de utilidad como vacunas para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1).

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante fisiológicamente aceptable. En algunas formas de realización, el adyuvante empleado provee una mayor inmunogenicidad de la composición farmacéutica. Dicho compuesto o adyuvante estimulante adicional de la respuesta inmunológica se puede (i) mezclar con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención después de la reconstitución de los péptidos y una emulsión opcional con un adyuvante basado en aceite definido antes, (ii) formar parte de la composición reconstituida de la presente invención definida antes, (iii) unir físicamente a uno o más péptidos a reconstituir o (iv) administrar por separado al sujeto, mamífero o humano que será tratado. El adyuvante puede ser uno que provee una liberación lenta del antígeno (por ejemplo, el adyuvante puede ser un liposoma), o puede ser un adyuvante que sea inmunogénico por sí mismo funcionando así de manera sinérgica con los antígenos. Por ejemplo, el adyuvante puede ser un adyuvante conocido u

otra sustancia que promueva la captación de antígenos, reclute células del sistema inmunológico hacia el sitio de la administración o facilite la activación inmunológica de las células linfoides respondedoras. Los adyuvantes incluyen, pero en un sentido no taxativo, moléculas inmunomoduladoras (por ejemplo, citoquinas), emulsiones de aceite y agua, hidróxido de aluminio, glucano, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato de sodio, Bacto-adyuvante, polímeros sintéticos tales como poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, aceite de parafina y muramilo dipéptido. En algunas formas de realización, el adyuvante es el Adyuvante 65, α-GalCer, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, péptido β-glucano, CpG DNA, GM-CSF, GPI-0100, IFA, IFN-γ, IL-17, lípido A, lipopolisacárido, Lipovant, Montanide™, N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, Pam3CSK4, Quil A, dimicolato de trehalosa o zimosán.

En algunas formas de realización, el adyuvante es una molécula inmunomoduladora. Por ejemplo, la molécula inmunomoduladora puede ser una proteína recombinante, una citoquina, una quimioquina o un agente o ácido nucleico inmunoestimulante que codifica citoquinas, quimioquinas o agentes inmunoestimulantes diseñados para mejorar la respuesta inmunológica.

Los ejemplos de citoquinas inmunomoduladoras incluyen interferones (por ejemplo, IFNα, IFNβ e IFNγ), interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17 e IL-20), factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNFα y TNFβ), eritropoyetina (EPO), el ligando FLT-3, gIp10, TCA-3, MCP-1, MIF, MIP-1.alfa., MIP-1β, Rantes, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), así como fragmentos funcionales de cualquiera de ellos.

En algunas formas de realización, también se puede incluir una quimioquina inmunomoduladora que se una a un receptor de quimioquina, es decir, un receptor de una quimioquina CXC, CC, C o CX3C, en las composiciones provistas en la presente. Los ejemplos de quimioquinas incluyen, pero en un sentido no taxativo, Mip1α, Mip-1β, Mip-3α (Larc), Mip-3β, Rantes, Hcc-1, Mpif-1, Mpif-2, Mcp-1, Mcp-2, Mcp-3, Mcp-4, Mcp-5, Eotaxina, Tarc, Elc, I309, IL-8, Gcp-2 Gro-α, Gro-β, Gro-γ, Nap-2, Ena-78, Gcp-2, Ip-10, Mig, I-Tac, Sdf-1 y Bca-1 (Blc), así como fragmentos funcionales de cualquiera de ellas.

En algunas formas de realización, la composición comprende una proteína de unión (por

ejemplo, un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un CAR o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector), un polipéptido TCRα y/o TCRβ descritos en la presente. En algunas formas de realización, la composición comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de unión, un polipéptido TCRα y/o TCRβ descritos en la presente, tal como una molécula de ADN que codifica una proteína de unión, un polipéptido TCRα y/o TCRβ. En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un marco de lectura abierto que codifica una proteína de unión, un polipéptido TCRα y/o TCRβ.

Cuando es captado por una célula (por ejemplo, células T, células NK, etc.), puede haber una molécula de ADN en la célula, como una molécula extracromosómica y/o se puede integrar en el cromosoma. El ADN se puede introducir en las células en la forma de un plásmido que puede permanecer como un material genético separado. Como alternativa, los ADN lineales que se pueden integrar en el cromosoma se pueden introducir en la célula. Opcionalmente, cuando se introduce ADN en una célula, se pueden agregar reactivos que promueven la integración de ADN en los cromosomas.

IX. Usos y métodos

Las composiciones que se describen en la presente se pueden usar en una variedad de aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas. En cualquier método según se describe en la presente, tal como un método de diagnóstico, método de pronóstico, método terapéutico o una combinación de los mismos, todos los pasos del método pueden ser realizados por un solo actor o, como alternativa, por más de un actor. Por ejemplo, el diagnóstico lo puede realizar directamente el actor que provee el tratamiento terapéutico. Como alternativa, una persona que provee un agente terapéutico puede solicitar que se realice un ensayo de diagnóstico. El diagnosticador y/o el intervencionista terapéutico pueden interpretar los resultados del ensayo de diagnóstico para determinar una estrategia terapéutica. De manera similar, estos procesos alternativos se pueden aplicar a otros ensayos, tales como los ensayos de pronóstico.

En algunos usos y métodos que abarca la presente invención, se utilizan sujetos o muestras de sujetos. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal. El animal puede ser de cualquier sexo y puede estar en cualquier etapa de su desarrollo. En algunas formas de realización, el animal es un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. En algunas formas de

realización, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal domesticado, por ejemplo, un perro, gato, vaca, cerdo, caballo, oveja o cabra. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de compañía, por ejemplo, un perro o un gato. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de ganado, como una vaca, cerdo, caballo, oveja o cabra. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de zoológico. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal de investigación, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), un perro, un cerdo o un primate no humano. En algunas formas de realización, el animal es un animal modificado genéticamente. En algunas formas de realización, el animal es un animal transgénico (por ejemplo, ratones transgénicos y cerdos transgénicos). En algunas formas de realización, el sujeto es un pez o un reptil.

En algunas formas de realización, el sujeto es un roedor, por ejemplo, un ratón. En algunas de tales formas de realización, el ratón es un ratón transgénico, tal como un ratón que expresa moléculas del MHC humano (es decir, HLA) tales como HLA-B72 (por ejemplo, Nicholson y col. (2012) Adv. Hematol. 2012: 404081). En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa TCR humanos o es un ratón antígeno negativo (por ejemplo, Li y col. (2010) Nat. Med. 16: 1029-1034 y Obenaus y col. (2015) Nat. Biotechnol 33: 402-407). En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa moléculas de la HLA humanas y TCR humanos. En algunas formas de realización, tal como donde el sujeto es un ratón transgénico para HLA, se modifican los TCR identificados, por ejemplo, para que sean quiméricos o humanizados. En algunas formas de realización, el andamiaje de TCR se ha modificado, de manera análoga a los métodos conocidos de humanización de proteínas de unión.

En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un modelo animal de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, el trastorno hiperproliferativo o la recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de un antígeno MAGEA1). Por ejemplo, el modelo de animales puede ser un modelo de animales con xenoinjertos ortotópicos de un cáncer derivado de un ser humano.

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

Los métodos que se describen en la presente se pueden usar para tratar a un sujeto que lo necesita. Tal como se usa en la presente, un “sujeto que lo necesita” incluye cualquier sujeto que padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, una recaída de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 y/o que tiene predisposición de padecer un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. Tal como se describe en la presente, un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 puede ser un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1.

En algunas formas de realización de los métodos que abarca la presente invención, el sujeto no ha sido sometido a un tratamiento para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, como quimioterapia, radioterapia, terapia direccionada y/o inmunoterapias. En algunas formas de realización, el sujeto ha sido sometido a un tratamiento para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, como quimioterapia, radioterapia, terapia direccionada y/o inmunoterapias.

En algunas formas de realización, el sujeto ha sido sometido a una cirugía para extirpar tejido canceroso o precanceroso. En algunas formas de realización, el tejido canceroso no se ha eliminado, por ejemplo, el tejido canceroso puede estar ubicado en una región inoperable del cuerpo, por ejemplo, en un tejido que es esencial para la vida, o en una región donde un procedimiento quirúrgico causaría una considerable riesgo de daño al paciente.

En algunas formas de realización, el sujeto o las células del mismo son resistentes a una terapia de relevancia, por ejemplo, pueden ser resistentes a la terapia estándar de atención, terapia con inhibidores de puntos de control inmunológico, y semejantes. Por ejemplo, la modulación de uno o más biomarcadores que abarca la presente invención puede superar la resistencia a la terapia con inhibidores de puntos de control inmunológico.

En algunas formas de realización, los sujetos necesitan una modulación de acuerdo con las composiciones y métodos que se describen en la presente, por ejemplo, puede haber sido detectado que presentan una ausencia, presencia o expresión aberrante de MAGEA1 que no se desea.

a. Métodos de diagnóstico

En un aspecto que abarca la presente invención, aquí se proveen métodos de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un antígeno MAGEA1, un complejo antígeno

MAGEA1-MHC, una célula de interés que expresa MAGEA1 y/o una célula que ha sido expuesta a MAGEA1, que comprende detectar la presencia o ausencia de dicho antígeno MAGEA1 en una muestra mediante el uso de por lo menos una proteína de unión, o por lo menos una célula huésped según se describe en la presente. En algunas formas de realización, el método comprende además obtener la muestra (por ejemplo, de un sujeto). En algunas formas de realización, por lo menos una proteína de unión o por lo menos una célula huésped forma un complejo con un epítopo peptídico MAGEA1 en el contexto de una molécula del MHC, y la detección del complejo se realiza en forma de una clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un ensayo de radioinmunidad (RIA), inmunoquímicamente, transferencia de Western o un ensayo de flujo intracelular.

En un aspecto que abarca la presente invención, en la presente se proveen métodos de diagnóstico para detectar el nivel de MAGEA1 o de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, tal como un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1 en un sujeto, que comprende: a) poner una muestra obtenida del sujeto en contacto con por lo menos un agente (por ejemplo, un péptido inmunogénico MAGEA1, un complejo de un péptido inmunogénico MAGEA1-MHC (pMHC), una proteína de unión, por lo menos una célula huésped o una población de células huésped descritas en la presente; y b) detectar el nivel de reactividad, en donde un mayor nivel de reactividad en comparación con un nivel control indica el nivel de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1) en el sujeto.

En algunas formas de realización, el nivel de reactividad está indicado por activación o la función efectora de células T, tal como, pero en un sentido no taxativo, la proliferación, la citotoxicidad o la liberación de citoquinas de células T. El nivel control puede ser un número de referencia o el nivel de un sujeto sano que no ha estado expuesto a un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1.

Se puede obtener una muestra biológica de un sujeto para determinar la presencia y el nivel

de una respuesta inmunológica al antígeno peptídico (por ejemplo, un antígeno MAGEA1) tal como se describe en la presente. Tal como se usa en la presente, una "muestra biológica" puede ser una muestra de sangre (a partir de la cual se puede preparar suero o plasma), una muestra de biopsia, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, PBMC aisladas, células T aisladas, lavado pulmonar, de ascitis, lavados de mucosas, líquido, etc.), médula ósea, ganglios linfáticos, tejido explantado, cultivo de órganos, o cualquier otro tejido o preparado celular procedente del sujeto o de una fuente biológica. También se pueden obtener muestras biológicas del sujeto antes de que reciba cualquier composición farmacéutica, donde dicha muestra biológica es útil como control para establecer datos de línea basal.

Las respuestas de las células T específicas de antígeno por lo general se determinan por comparación de las respuestas de células T observadas de acuerdo con cualquiera de los parámetros funcionales de células T que se describen en la presente (por ejemplo, proliferación, liberación de citoquinas, actividad de CTL, alteraciones en fenotipos de marcadores en la superficie celular, etc.) que se pueden realizar entre células T expuestas a un antígeno cognado en un contexto apropiado (por ejemplo, el antígeno utilizado para cebar o activar las células T, cuando es presentado por células presentadoras de antígeno inmunocompatibles) y células T de la misma población de origen que en cambio se exponen a un antígeno de control estructuralmente distinto o irrelevante. Una respuesta al antígeno cognado que es mayor, con significación estadística, que la respuesta al antígeno de control significa que hay especificidad de antígeno.

El nivel de una respuesta inmunológica, por ejemplo, una respuesta inmunológica de una célula T citotóxica (CTL), se puede determinar mediante cualquiera de los numerosos métodos inmunológicos que se describen en la presente y se practican de manera rutinaria en el arte. Por ejemplo, se puede determinar el nivel de una respuesta inmunitaria de la CTL antes y después de administrar cualquiera de las proteínas de unión que se describen en la presente expresadas, por ejemplo, por una célula T Los ensayos de citotoxicidad para determinar la actividad de la CTL se pueden realizar utilizando cualquiera de varias técnicas y métodos que se practican de manera rutinaria en este campo (por ejemplo, Henkart y col., *"Cytotoxic T-Lymphocytes"* en Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA), páginas 1127-50, y referencias que se citan allí).

La presente invención provee, en parte, métodos, sistemas y códigos para clasificar con

precisión si una muestra biológica está asociada con un resultado de interés, tal como la expresión de una diana de interés, por ejemplo, MAGEA1. En algunas formas de realización, la presente invención es útil para clasificar una muestra (por ejemplo, proveniente de un sujeto) como asociada o en riesgo de responder o no responder a la terapia para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 utilizando un algoritmo estadístico y/o datos empíricos.

Un ejemplo de método para detectar la cantidad o actividad de MAGEA1 y, por lo tanto, útil para clasificar si es probable o improbable que una muestra responda a una terapia para un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 incluye poner en contacto una muestra biológica con un agente, por ejemplo, un péptido inmunogénico MAGEA1 o un agente de unión según se describe en la presente, capaz de detectar la cantidad o actividad de MAGEA1 en la muestra biológica. En algunas formas de realización, el método además comprende obtener una muestra biológica, por ejemplo, de un sujeto de prueba. En algunas formas de realización, se usa por lo menos un agente, y se pueden utilizar dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de dichos agentes en combinación (por ejemplo, en ELISA tipo sándwich) o en serie. En ciertos casos, el algoritmo estadístico es un sistema de clasificación estadística de aprendizaje único. Por ejemplo, se puede utilizar un único sistema de clasificación estadística de aprendizaje para clasificar una muestra basándose en un valor de predicción o probabilidad y la presencia o el nivel del biomarcador. En el uso de un único sistema de clasificación estadística con aprendizaje por lo general se clasifica la muestra en base a una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y/o precisión general de por lo menos aproximadamente 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %.

Los especialistas en el arte conocen bien otros algoritmos estadísticos apropiados. Por ejemplo, los sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen una técnica algorítmica de aprendizaje automático capaz de adaptarse a conjuntos de datos complejos (por ejemplo, un panel de marcadores de interés) y pueden tomar decisiones basadas en dichos conjuntos de datos. En algunas formas de realización, a sistema de clasificación estadística de aprendizaje único tal como a árbol de clasificación (por ejemplo, bosque aleatorio) is used. En otras formas de realización, se usa una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10 o más sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje, preferiblemente en tándem. Los ejemplos de sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen, pero de manera no taxativa, a aquellos que utilizan el aprendizaje inductivo (por ejemplo, árboles de decisión/clasificación como bosques aleatorios, árboles de clasificación y regresión (C&RT), árboles potenciados, etc.), aprendizaje Correcto Probablemente Aproximadamente (PAC), aprendizaje conexionista (por ejemplo, redes neuronales (NN), redes neuronales artificiales (ANN), redes neuronales difusas (NFN), estructuras de red, perceptrones tales como perceptrones multicapa, redes de alimentación directa multicapa, aplicaciones de redes neuronales, aprendizaje bayesiano en redes de creencias, etc.), aprendizaje reforzado (por ejemplo, aprendizaje pasivo en un entorno conocido como el aprendizaje ingenuo, aprendizaje dinámico adaptativo y aprendizaje de diferencias temporales, aprendizaje pasivo en un entorno desconocido, aprendizaje activo en un entorno desconocido, aprendizaje de funciones de acción-valor, aplicaciones de aprendizaje reforzado, etc.), y algoritmos genéticos y programación evolutiva. Otros sistemas clasificadores estadísticos de aprendizaje incluyen máquinas de vectores de soporte (por ejemplo, métodos Kernel), *splines* de regresión adaptativa multivariante (MARS), algoritmos de Levenberg-Marquardt, algoritmos de Gauss-Newton, mezclas gaussianas, algoritmos de descenso de gradientes y aprendizaje por cuantificación vectorial (LVQ). En determinadas formas de realización, el método abarcado por la presente invención comprende además el envío de los resultados de la clasificación de la muestra a un médico, por ejemplo, un oncólogo.

En algunas formas de realización, el diagnóstico de un sujeto (por ejemplo, incluyendo la tipificación de HLA y/o la pérdida de heterocigosidad (LOH) para determinar la compatibilidad con el la unión al complejo de TCR-HLA por los TCR de interés) es seguido por la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento definido basado en el diagnóstico.

En algunas formas de realización, los métodos incluyen además la obtención de una muestra biológica de control (por ejemplo, una muestra biológica de un sujeto que no padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, un sujeto que está en remisión, un sujeto cuyo trastorno es susceptible de terapia, un sujeto cuyo trastorno está progresando u otros temas de interés).

En algunas formas de realización de los métodos analíticos que se describen en la presente,

la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, en una muestra de un sujeto) se compara con una muestra de control predeterminada (estándar). La muestra del sujeto es típicamente de un tejido enfermo, por ejemplo, células o tejidos cancerosos. La muestra de control puede ser del mismo sujeto o de un sujeto diferente. La muestra de control es típicamente una muestra normal, sin la enfermedad. Sin embargo, en algunas formas de realización, por ejemplo, para la estadificación de una enfermedad o para evaluar la eficacia del tratamiento, la muestra de control puede ser de un tejido enfermo. La muestra de control puede ser una combinación de muestras de varios sujetos diferentes. En algunas formas de realización, la(s) medición(es) de la expresión de MAGEA1 en un sujeto se compara(n) con un nivel predeterminado. Este nivel predeterminado se obtiene típicamente de muestras normales. Tal como se describe en la presente, se puede usar una expresión "predeterminada" para, solo a manera de ejemplo, evaluar un sujeto que pueda ser seleccionado para el tratamiento, evaluar una respuesta al cáncer y/o evaluar una respuesta a una terapia combinada contra el cáncer. Se puede determinar una cantidad predeterminada de biomarcadores y/o medidas de actividad en poblaciones de pacientes con o sin un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. La cantidad predeterminada de biomarcadores y/o las mediciones de actividad pueden ser un solo número, que se puede aplicar por igual a cada paciente, o la cantidad predeterminada de biomarcadores y/o las mediciones de actividad pueden variar dependiendo de las subpoblaciones específicas de pacientes. La edad, el peso, la altura y otros factores de un sujeto pueden afectar la cantidad predeterminada de biomarcadores y/o las mediciones de actividad del individuo. Además, la cantidad y/o actividad predeterminada del biomarcador se puede determinar para cada sujeto individualmente En una forma de realización, las cantidades determinadas y/o comparadas en un método según se describe en la presente se basan en mediciones absolutas.

En otra forma de realización, las cantidades determinadas y/o comparadas en un método según se describe en la presente se basan en mediciones relativas, tales como relaciones (por ejemplo, números de copias de biomarcadores, nivel y/o actividad antes de un tratamiento en comparación con las posteriores al tratamiento, tales como mediciones de biomarcadores con relación a un control enriquecido o artificial, tales como mediciones de biomarcadores con relación a la expresión de un gen de mantenimiento y similares). Por ejemplo, el análisis relativo puede basarse en la relación entre mediciones de biomarcadores

antes del tratamiento en comparación con la medición de biomarcadores después del tratamiento. La medición de biomarcadores antes del tratamiento se puede realizar en cualquier momento antes del inicio de una terapia. La medición de biomarcadores después del tratamiento se puede realizar en cualquier momento después del inicio de la terapia. En algunas formas de realización, las mediciones de biomarcadores posteriores al tratamiento se realizan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 semanas o más después del inicio de la terapia, e incluso más, y hasta durante un período indefinido, para un seguimiento continuo. El tratamiento puede comprender una terapia para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, ya sea solo o en combinación con otros agentes, tales como agentes anticancerosos como quimioterapia o inhibidores de puntos de control inmunológico.

La expresión predeterminada de MAGEA1 puede ser cualquier estándar apropiado. Por ejemplo, la expresión predeterminada de MAGEA1 se puede obtener del mismo sujeto o de un sujeto diferente para el que se está evaluando una selección de sujetos. En una forma de realización, la cantidad de biomarcador predeterminada y/o las mediciones de actividad se pueden obtener a partir de una evaluación previa del mismo paciente. De esta manera, el progreso de selección del paciente se puede monitorear a lo largo del tiempo. Además, el control se puede obtener de una evaluación de otro ser humano o de múltiples seres humanos, por ejemplo, grupos seleccionados de seres humanos, si el sujeto es un ser humano. De tal manera, el alcance de la selección del ser humano para el que se está evaluando la selección se puede comparar con otros seres humanos apropiados, por ejemplo, otros seres humanos que se encuentran en una situación similar a la del ser humano de interés, tales como aquellos que padecen enfermedades similares o la(s) misma(s) condición(es) y/o del mismo grupo étnico.

En algunas formas de realización abarcadas por la presente invención el cambio de la expresión de MAGEA1 desde el nivel predeterminado es de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, o 5,0 veces o más, o cualquier rango entre dichos valores, inclusive. Dichos valores de corte se aplican igualmente cuando la medición se basa en cambios relativos, como por ejemplo, en la relación de la medición de biomarcadores antes del tratamiento en comparación con la medición de biomarcadores después del tratamiento.

En algunas formas de realización, la expresión de MAGEA1 se puede detectar y/o cuantificar detectando o cuantificando el polipéptido MAGEA1 o su antígeno, por ejemplo, mediante el uso de una composición según se describe en la presente. El polipéptido se puede detectar y cuantificar mediante cualquiera de diversos medios bien conocidos por los especialistas en el arte, tales como inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, transferencia de Western, ensayos de ligando-ligando, técnicas inmunohistoquímicas, aglutinación, ensayos de complemento, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión y otros similares (por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, Sites y Terr, eds., Appleton y Lange, Norwalk, Connecticut, páginas 217-262, 1991).

b. Métodos terapéuticos

En un aspecto que abarca la presente invención, en la presente se proveen métodos para prevenir y/o tratar un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1, y/o para inducir una respuesta inmunológica contra una célula de interés, tal como una célula hiperproliferativa, que expresa MAGEA1. En algunas formas de realización, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en la presente, tal como una composición inmunogénica, tal como una composición que comprende células que expresan por lo menos una proteína de unión y semejantes. Los métodos comprendidos en la presente invención también se pueden usar para determinar la capacidad de respuesta a una terapia de cáncer contra muchos trastornos diferentes caracterizados por la expresión de MAGEA1 en sujetos, tales como los que se describen en la presente.

En algunas formas de realización, el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 es un cáncer. Los términos “cáncer” o “tumor” o “hiperproliferativo” se refieren a la presencia de células que poseen las características típicas de las células que causan cáncer, tales como una proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial invasivo o metastásico, crecimiento rápido y determinados rasgos morfológicos característicos. En algunas formas de realización, dichas células exhiben dichas características en parte o por completo debido a la expresión y actividad de las proteínas de los puntos de control inmunológicos, tales como PD-1, PD-L1,

PD-L2 y/o CTLA-4.

Las células cancerosas a menudo se encuentran en la forma de un tumor, pero dichas células pueden existir solas dentro de un animal, o pueden comprender una célula cancerosa no tumorigénica, tal como en un cáncer hematológico, como la leucemia. Tal como se usa en la presente, el término “cáncer” incluye cánceres premalignos así como malignos. Los cánceres incluyen, pero en un sentido no taxativo, una variedad de cánceres, carcinomas que incluyen los de la vejiga (incluido el cáncer de vejiga acelerado y metastásico), de mama, de colon (incluido cáncer colorrectal), de riñón, de hígado, de pulmón (incluido cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículo, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (inclusive carcinoma del páncreas exócrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides y piel (inclusive carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos del linaje linfoide que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítica y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide que incluyen leucemias mielogénicas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwanomas; tumores de origen mesenquimático que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; otros tumores que incluyen melanoma, xeroderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma; melanoma, melanoma maligno en etapa III o IV no extirpable, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, cáncer de hueso, tumores óseos, histiocitoma fibroso maligno óseo de adultos; histiocitoma fibroso maligno óseo de niños, sarcoma, sarcoma pediátrico, células asesinas naturales sinonasales, neoplasias, neoplasia de células plasmáticas; síndromes mielodisplásicos; neuroblastoma; tumor de células germinales testicular, melanoma intraocular, síndromes

mielodisplásicos; enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, sarcoma sinovial, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Filadelfia positivo (Ph+ ALL), mieloma múltiple, leucemia mielogénica aguda, leucemia linfocítica crónica, mastocitosis y cualquier síntoma asociado con una mastocitosis, y todas las metástasis de los mismos. Además, los trastornos incluyen urticaria pigmentosa, mastocitosis tales como mastocitosis cutánea difusa, mastocitoma solitario en humanos, así como mastocitoma de perros y algunos subtipos raros como mastocitosis bullosa, eritrodérmica y teleangiectásica, mastocitosis con un trastorno hematológico asociado, tal como un síndrome mieloproliferativo o mielodisplásico, o leucemia aguda, trastorno mieloproliferativo asociado con mastocitosis, leucemia de mastocitos, además de otros cánceres. Hay otros cánceres que también están incluidos en el alcance de los trastornos incluyen, pero en un sentido no taxativo, los que siguen: carcinoma, inclusive los de la vejiga, carcinoma urotelial, de mama, de colon, de riñón, de hígado, de pulmón, de ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, testículos, en particular seminomas testiculares, y de piel; inclusive carcinoma de células escamosas; tumores del estroma gastrointestinal (“GIST”); tumores hematopoyéticos del linaje linfoide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos del linaje mieloide, que incluyen leucemias mielogénicas aguda y crónica y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, que incluyen fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; otros tumores, inclusive melanoma, seminoma, tetratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwanomas; tumores de origen mesenquimático, que incluyen fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xeroderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides, teratocarcinoma, tumores de células germinales no seminomatosas refractarios a una quimioterapia y sarcoma de Kaposi, y todas las metástasis de los mismos. Otros ejemplos no limitantes de tipos de cánceres aplicables a los métodos comprendidos por la presente invención incluyen sarcomas y carcinomas humanos, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma,

tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de hueso, tumor de cerebro, carcinoma de pulmón (incluido el adenocarcinoma de pulmón), carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica) y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadenas pesadas. En algunas formas de realización, los cánceres son de naturaleza epitelial e incluyen, pero en un sentido no taxativo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cánceres ginecológicos, cáncer renal, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer oral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de piel. En algunas formas de realización, el cáncer epitelial es cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales no papilares, carcinoma cervical, carcinoma de ovario (por ejemplo, carcinoma de ovario seroso) o carcinoma de mama. Los cánceres epiteliales se pueden caracterizar de otras diversas maneras que incluyen, pero en un sentido no taxativo, serosos, endometrioides, mucinosos, de células claras, de Brenner o no diferenciados. En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón de células no pequeñas (avanzado), melanoma, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer urotelial de vejiga (avanzado), cáncer de riñón (RCC) (avanzado), cáncer con gran inestabilidad por microsatélites, linfoma de Hodgkin clásico, cáncer gástrico (avanzado), cáncer de cuello uterino (avanzado), linfoma de células B del mediastino primario, carcinoma hepatocelular (avanzado), cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, carcinoma de mama invasivo, carcinoma urotelial de vejiga y carcinoma de células de Merkell (avanzado).

Además, las composiciones que se describen en la presente también se pueden administrar en terapia de combinación para modular adicionalmente una actividad que se desee. Los agentes adicionales incluyen, sin limitaciones, agentes quimioterapéuticos, hormonas, antiangiógenos, compuestos radiomarcados o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. Los métodos de tratamiento anteriores se pueden administrar junto con otras formas de terapia convencionales (por ejemplo, tratamientos estándar de atención para el cáncer bien conocidos por los especialistas en el arte), ya sea consecutivamente con la terapia preconvencional o posconvencional. Por ejemplo, estos agentes moduladores se pueden administrar con una dosis terapéuticamente eficaz de agente quimioterapéutico. En otra forma de realización, estos agentes moduladores se administran junto con quimioterapia para mejorar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico. Physicians' Desk Reference (PDR) describe las dosis de agentes quimioterapéuticos que se han utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. El régimen de dosificación y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerán del melanoma en particular que se esté tratando, de la extensión de la enfermedad y de otros factores familiares para el médico especialista en el arte y que pueden ser determinados por el médico.

La terapia que usa una o más composiciones que se describen en la presente, ya sea solas o en combinación con otras terapias, como las terapias contra el cáncer, se puede usar para entrar en contacto con células que expresan MAGEA1 y/o para administrarlas a un sujeto que se desea, tal como un sujeto con indicación de que es probable que responda a la terapia. En otra forma de realización, dicha terapia puede evitarse una vez que se indique que es probable que un sujeto no responda a la terapia (por ejemplo, según se evalúe de acuerdo con un método de diagnóstico o pronóstico descrito en la presente) y un régimen de tratamiento alternativo, por ejemplo, se pueden recomendar y/o administrar terapias contra el cáncer direccionadas y/o no direccionadas.

El término "terapia dirigida" se refiere a la administración de agentes que interactúan selectivamente con una biomolécula seleccionada así para tratar el cáncer. Por ejemplo, la terapia direccionada con respecto a la inhibición del inhibidor del punto de control inmunológico es útil en combinación con los métodos que abarca la presente invención.

El término "inmunoterapia" o "inmunoterapias" se refiere en general a cualquier estrategia para modular una respuesta inmunológica de una manera beneficiosa y abarca el tratamiento

de un sujeto que padece una recurrencia de una enfermedad o en riesgo de contraer o sufrir una enfermedad mediante un método que comprende inducir, potenciar, suprimir o modificar de otra manera una respuesta inmunológica, así como cualquier tratamiento que utilice determinadas partes del sistema inmunológico de un sujeto para combatir enfermedades, como el cáncer. El propio sistema inmunológico del sujeto se estimula (o suprime), con o sin la administración de uno o más agentes para ese propósito. Las inmunoterapias que están diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmunológica se denominan "inmunoterapias de activación". Las inmunoterapias que están diseñadas para reducir o suprimir una respuesta inmunológica se denominan “inmunoterapias de supresión”. En algunas formas de realización, una inmunoterapia es específica para células de interés, como las células cancerosas. En algunas formas de realización, la inmunoterapia puede ser "no direccionada", lo que se refiere a la administración de agentes que no interactúan selectivamente con las células del sistema inmunológico, pero modulan la función del sistema inmunológico. Algunos ejemplos representativos de terapias no dirigidas incluyen, sin limitación, quimioterapia, terapia génica y radioterapia.

Algunas formas de inmunoterapia son terapias dirigidas que pueden comprender, por ejemplo, el uso de vacunas contra el cáncer y/o células presentadoras de antígenos sensibilizadas. Por ejemplo, un virus oncolítico es un virus que puede infectar y lisar las células cancerosas, sin dañar las células normales, lo que los hace potencialmente útiles en la terapia del cáncer. La replicación de los virus oncolíticos facilita la destrucción de las células tumorales y también produce una amplificación de la dosis en el sitio del tumor. También pueden actuar como vectores de genes anticancerígenos, lo que permite suministrarlos específicamente en el sitio del tumor. La inmunoterapia puede incluir inmunidad pasiva para la protección a corto plazo de un huésped, que se obtiene mediante la administración de un anticuerpo preformado dirigido contra un antígeno de cáncer o antígeno de enfermedad (por ejemplo, la administración de un anticuerpo monoclonal, opcionalmente unido a un agente quimioterapéutico o toxina, a un antígeno tumoral). La inmunoterapia también puede centrarse en el uso de epítopos de líneas celulares cancerosas reconocidos por linfocitos citotóxicos. Como alternativa, se pueden usar polinucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARN de interferencia, polinucleótidos de triple hélice y similares para modular selectivamente biomoléculas que están vinculadas con el inicio, el progreso y/o patología de un tumor o

cáncer. De manera similar, la inmunoterapia puede tomar la forma de terapias basadas en células. Por ejemplo, la inmunoterapia celular adoptiva es un tipo de inmunoterapia que utiliza células inmunológicas, como las células T, que tienen una reactividad natural o genéticamente modificada al cáncer de un paciente y luego se transfieren de nuevo al paciente con cáncer. La inyección de un gran número de células T específicas del tumor activadas puede inducir una regresión completa y duradera de los tipos de cáncer.

Una inmunoterapia puede incluir inmunidad pasiva para la protección a corto plazo de un huésped, que se obtiene mediante la administración de un anticuerpo preformado dirigido contra un antígeno de cáncer o antígeno de enfermedad (por ejemplo, la administración de un anticuerpo monoclonal, opcionalmente unido a un agente quimioterapéutico o toxina, a un antígeno tumoral). La inmunoterapia también puede centrarse en el uso de epítopos de líneas celulares cancerosas reconocidos por linfocitos citotóxicos. Como alternativa, se pueden usar polinucleótidos antisentido, ribozimas, moléculas de ARN de interferencia, polinucleótidos de triple hélice y similares para modular selectivamente biomoléculas que están vinculadas con el inicio, el progreso y/o patología de un tumor o cáncer.

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

En algunas formas de realización, la inmunoterapia comprende inhibidores de uno o más puntos de control inmunológico. El término "punto de control inmunológico" se refiere a un grupo de moléculas en la superficie celular de las células T CD4+ y/o CD8+ que realizan un ajuste fino de las respuestas inmunológicas mediante la modulación de las respuestas inmunológicas anticancerígenas, tales como la reducción de la expresión o la inhibición de una respuesta inmunológica antitumoral. Las proteínas de puntos de control inmunológico son

bien conocidas en el arte e incluyen, en un sentido no taxativo, CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, ICOS, HVEM, PD-L2, CD200R, CD160, gp49B, PIR-B, KRLG-1, familia de receptores KIR, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3 (CD223), IDO, GITR, 4-IBB, OX-40, BTLA, SIRPalpha (CD47), CD48, 2B4 (CD244), B7,1, B7,2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, HHLA2, butirofilinas y A2aR (véase, por ejemplo, WO 2012/177624). El término abarca además fragmentos de proteínas biológicamente activas, así como ácidos nucleicos que codifican proteínas de puntos de control inmunológico de longitud completa.

Algunos puntos de control inmunológicos son "puntos de control inmunológico inmuno-inhibidores" que abarcan moléculas (por ejemplo, proteínas) que inhiben, reducen la expresión o suprimen una función del sistema inmunológico (por ejemplo, una respuesta inmunológica). Por ejemplo, PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), que también se conoce como CD274 o B7-H1, es una proteína que transmite una señal inhibidora que reduce la proliferación de células T para inhibir el sistema inmunológico. CTLA-4 (proteína 4 asociada a células T citotóxicos), que también se conoce como CD152, es un receptor de proteína en la superficie de las células presentadoras de antígeno que sirve como un punto de control inmunológico (interruptor de "apagado") para regular negativamente las respuestas inmunológicas. TIM-3 (inmunoglobulina de células T y dominio que contiene mucina-3), que también se conoce como HAVCR2, es una proteína de la superficie celular que sirve como un punto de control inmunológico para regular la activación de los macrófagos. VISTA (supresor de Ig de dominio V la activación de células T) es una proteína transmembrana de tipo I que funciona como un punto de control inmunológico para inhibir la función efectora de las células T y mantener la tolerancia periférica. LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos) es un receptor de punto de control inmunológico que regula negativamente la proliferación, activación y homeostasis de las células T. BTLA (atenuador de linfocitos B y T) es una proteína que muestra inhibición de células T a través de interacciones con la familia de receptores de necrosis tumoral (TNF-R). KIR (receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas) es una familia de proteínas expresadas en las células NK, y una minoría de células T, que suprimen la actividad citotóxica de las células NK. En algunas formas de realización, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser agentes específicos de enzimas inmunosupresoras tales como inhibidores que pueden bloquear las actividades de la arginasa (ARG) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una proteína de punto de control inmunológico que suprime las células T y las células NK, que

cambian el catabolismo de los aminoácidos arginina y triptofano en el microambiente tumoral inmunosupresor. Los inhibidores pueden incluir, pero de manera no taxativa, a: N-hidroxi-L-Arg (NOHA) dirigida hacia macrófagos M2 que expresan ARG, nitroaspirina o sildenafil (Viagra®), que bloquea simultáneamente la ARG y la óxido nítrico sintasa (NOS); e inhibidores de IDO, como 1-metil-triptofano. El término abarca además a los fragmentos de proteína biológicamente activos, así como a los ácidos nucleicos que codifican proteínas de punto de control inmunológico de longitud completa y fragmentos de proteínas biológicamente activas de las mismas. En alguna forma de realización, el término abarca además a cualquier fragmento de acuerdo con las descripciones de homología que se proveen en la presente.

Por el contrario, otros puntos de control inmunológico son "inmunoestimulantes" que abarcan moléculas (por ejemplo, proteínas) que activan, estimulan o promueven una función del sistema inmunológico (por ejemplo, una respuesta inmunológica). En algunas formas de realización, la molécula inmunoestimulante es CD28, CD80 (B7,1), CD86 (B7,2), 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), CD27, CD70, CD40, CD40L, CD122, CD226, CD30, CD30L, OX40, OX40L, HVEM, BTLA, GITR y su ligando GITRL, LIGHT, LTβR, LTáβ, ICOS (CD278), ICOSL (B7-H2) y NKG2D. CD40 (grupo de diferenciación 40) es una proteína coestimulante que se encuentra en las células presentadoras de antígeno y que es necesaria para su activación. OX40, que también se conoce como miembro 4 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF4) o CD134, participa en el mantenimiento de una respuesta inmunológica después de la activación al prevenir la muerte de las células T y posteriormente aumentar la producción de citoquinas. CD137 es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R) que coestimula las células T activadas para mejorar la proliferación y la supervivencia de las células T. CD122 es una subunidad de la proteína del receptor de interleuquina-2 (IL-2), que promueve la diferenciación de las células T inmaduras en células T reguladoras, efectoras o de memoria. El CD27 es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y sirve como una molécula de punto de control inmunológico coestimulante. CD28 (grupo de diferenciación 28) es una proteína expresada en las células T que provee señales coestimulantes necesarias para la activación y supervivencia de las células T. GITR (proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides), que también se conoce como TNFRSF18 y AITR, es una proteína que desempeña un papel clave en la autotolerancia inmunológica dominante mantenida por las

células T reguladoras. ICOS (coestimulante inducible de células T), que también se conoce como CD278, es una molécula coestimulante de la superfamilia CD28 que se expresa en las células T activadas y desempeña un papel en la señalización de las células T y las respuestas inmunológicas.

Los puntos de control inmunológico y sus secuencias son bien conocidos en el arte y más adelante se describen formas de realización representativas. Los puntos de control inmunológico generalmente se relacionan con pares de receptores inhibidores y los compañeros de unión naturales (por ejemplo, ligandos). Por ejemplo, los polipéptidos PD-1 son receptores inhibidores capaces de transmitir una señal inhibidora a una célula inmunológica para inhibir de esa manera la función efectora de la célula inmunológica, o son capaces de promover la coestimulación (por ejemplo, mediante inhibición competitiva) de las células inmunológicas, por ejemplo, cuando están presentes en forma monomérica soluble. Los miembros preferidos de la familia PD-1 comparten la identidad de secuencia con PD-1 y se unen a uno o más miembros de la familia B7, por ejemplo, a los ligandos B7-1, B7-2, PD-1 y/u otros polipéptidos en células presentadoras de antígeno. El término "actividad PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de modular una señal inhibidora en una célula inmunológica activada, por ejemplo, acoplando un ligando PD-1 natural a una célula presentadora de antígeno. La modulación de una señal inhibidora en una célula inmunológica da como resultado la modulación de la proliferación y/o secreción de citoquinas por una célula inmunológica. Por lo tanto, el término "actividad PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de unirse a su ligando o ligandos naturales, la capacidad de modular las señales inhibidoras de las células inmunológicas y la capacidad de modular la respuesta inmunológica. El término "ligando PD-1" se refiere a los compañeros de unión del receptor PD-1 e incluye tanto a PD-L1 (Freeman y col. (2000) J. Exp. Med. 192: 1027-1034) como a PD-L2 (Latchman y col. (2001) Nat. Immunol. 2: 261). El término "actividad de ligando PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido del ligando PD-1 de unirse a su receptor o receptores naturales (por ejemplo, PD-1 o B7-1), la capacidad de modular las señales inhibidoras de las células inmunológicas y la capacidad de modular la respuesta inmunológica.

Tal como se usa en la presente, el término "terapia de puntos de control inmunológico" se refiere al uso de agentes inhibidores que inhiben los puntos de control inmunológico, por ejemplo, por inhibición de sus ácidos nucleicos y/o proteínas. La inhibición de uno o más de

tales puntos de control inmunológico puede bloquear o neutralizar de otra manera la señalización inhibitoria para de esa manera regular aumentando una respuesta inmunológica con el fin de tratar más eficazmente el cáncer. Algunos ejemplos de agentes útiles para inhibir puntos de control inmunológico incluyen anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, ligandos naturales y derivados de ligandos naturales, que pueden unirse y/o desactivar o inhibir proteínas de puntos de control inmunológico, o fragmentos de las mismas; así como ARN de interferencia, antisentido, aptámeros de ácido nucleico, etc. que pueden regular reduciendo la expresión y/o actividad de ácidos nucleicos de puntos de control inmunológico, o fragmentos de los mismos. Algunos ejemplos de agentes para regular una respuesta inmunológica incrementándola incluyen anticuerpos contra una o más proteínas de puntos de control inmunológico que bloquean la interacción entre las proteínas y su receptor o receptores naturales; una forma no activante de una o más proteínas de punto de control inmunológico (por ejemplo, un polipéptido negativo dominante); moléculas pequeñas o péptidos que bloquean la interacción entre una o más proteínas de control inmunológico y su receptor o receptores naturales; proteínas de fusión (por ejemplo, la parte extracelular de una proteína inhibidora de un punto de control inmunológico fusionada con la parte Fc de un anticuerpo o inmunoglobulina) que se unen a su receptor o receptores naturales; moléculas de ácido nucleico que bloquean la transcripción o traducción de ácidos nucleicos en puntos de control inmunológico; y otros similares. Dichos agentes pueden bloquear directamente la interacción entre uno o más puntos de control inmunológico y su receptor o receptores naturales (por ejemplo, anticuerpos) para evitar la señalización inhibitoria y regular una respuesta inmunológica incrementándola. Como alternativa, los agentes pueden bloquear indirectamente la interacción entre una o más proteínas de punto de control inmunológico y su receptor o receptores naturales para evitar la señalización inhibitoria y regular una respuesta inmunológica incrementándola. Por ejemplo, una versión soluble de un ligando de proteína de punto de control inmunológico tal como un dominio extracelular estabilizado puede unirse a su receptor para reducir indirectamente la concentración eficaz del receptor para unirse a un ligando apropiado. En una forma de realización, se utilizan anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-PD-L2, solos o en combinación, para inhibir los puntos de control inmunológico. Los agentes terapéuticos usados para bloquear la vía de PD-1 incluyen anticuerpos antagonistas y ligandos de PD-L1 solubles. Los agentes antagonistas contra la

vía inhibidora de PD-1 y PD-L1/2 pueden incluir, entre otros, anticuerpos antagonistas de PD-1 o PD-L1/2 (por ejemplo, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 (que también se conoce como nivolumab o BMS-936558), 4A11, 7D3 y 5F4 que se describen en la Patente de EEUU No. 8.008.449; AMP-224, pidilizumab (CT-011), pembrolizumab, y anticuerpos que se describen en las Patentes de los EEUU Números 8.779.105; 8.552.154; 8.217.149; 8.168.757; 8.008.449; 7.488.802; 7.943.743; 7.635.757; y 6.808.710. De manera similar, los inhibidores de puntos de control representativos adicionales pueden ser, entre otros, anticuerpos contra el regulador inhibitorio CTLA-4 (antígeno 4 anti-linfocito T citotóxico), como ipilimumab, tremelimumab (completamente humanizado), anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA-4, anticuerpos anti-dominio CTLA-4, fragmentos de anticuerpo anti-CTLA-4 de cadena sencilla, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena pesada, fragmentos anti-CTLA-4 de cadena liviana y otros anticuerpos, tales como los que se describen en las Patentes de los EEUU Números 8.748.815; 8.529.902; 8.318.916; 8.017.114; 7.744.875; 7.605.238; 7.465.446; 7.109.003; 7.132.281; 6.984.720; 6.682.736; 6.207.156; y 5.977.318, así como la patente EP. Nº 1212422, publicaciones de Patente de los EEUU Números 2002/0039581 y 2002/086014, y Hurwitz y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 95: 10067-10071.

Las definiciones representativas de actividad de punto de control inmunológico, ligando, bloqueo y otras similares ejemplificadas para PD-1, PD-L1, PD-L2 y CTLA-4 son válidas en general para otros puntos de control inmunológico.

El término “terapia no dirigida” se refiere a la administración de agentes que no interactúan selectivamente con una biomolécula seleccionada pero aun así tratan el cáncer. Algunos ejemplos representativos de terapias no dirigidas incluyen, sin limitación, quimioterapia, terapia génica y radioterapia.

En una forma de realización, se usa quimioterapia. La quimioterapia incluye la administración de un agente quimioterapéutico. Dicho agente quimioterapéutico puede ser, de manera no taxativa, uno de aquellos que se seleccionan entre los siguientes grupos de compuestos: compuestos de platino, antibióticos citotóxicos, antimetabolitos, agentes antimitóticos, agentes alquilantes, compuestos de arsénico, inhibidores de la ADN topoisomerasa, taxanos, análogos de nucleósidos, alcaloides vegetales y toxinas; y derivados sintéticos de los mismos. Algunos ejemplos de agentes incluyen, pero de manera no taxativa, a: agentes alquilantes: mostazas de nitrógeno (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, clorambucilo, estramustina

y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU)), alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfán y treosulfán), triazenos (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida), cisplatino, treosulfán y trofosfamida; alcaloides vegetales: vinblastina, paclitaxel, docetaxol; inhibidores de la ADN topoisomerasa: tenipósido, crisnatol y mitomicina; anti-folatos: metotrexato, ácido micofenólico e hidroxiurea; análogos de pirimidina: 5-fluorouracilo, doxifluridina y citosina arabinósido, análogos de purina: mercaptopurina y tioguanina; Antimetabolitos de ADN: 2'-desoxi-5-fluorouridina, glicinato de afidicolina y pirazolimidazol; y agentes antimitóticos: halicondrina, colchicina y rizoxina. De manera similar, algunos ejemplos de agentes adicionales que incluyen compuestos que contienen platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), taxoides (por ejemplo, paclitaxel o un equivalente de paclitaxel tal como nanopartículas de paclitaxel unidas a albúmina (ABRAXANE), paclitaxel unido al ácido docosahexaenoico (DHA-paclitaxel, taxoprexina), paclitaxel unido a poliglutamato (PG-paclitaxel, paclitaxel poliglumex, CT-2103, XYOTAX), el profármaco activado por tumor (TAP) ANG1005 (Angiopep-2 unido a tres moléculas de paclitaxel), paclitaxel-EC-1 (paclitaxel unido al péptido EC-1 que reconoce erbB2) y paclitaxel conjugado con glucosa, por ejemplo, 2'-paclitaxel metil 2-glucopiranosil succinato; docetaxel, taxol), epipodofilinas (por ejemplo, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, topotecán, 9-aminocamptotecina, camptoirinotecán, irinotecán, crisnatol, mitomicina C), antimetabolitos, inhibidores de DHFR (por ejemplo, metotrexato, diclorometotrexato, trimetrexato, edatrexato), inhibidores de IMP deshidrogenasa (por ejemplo, ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina y EICAR), inhibidores de la ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiurea y deferoxamina), análogos de uracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina, doxifluridina, ratitrexed, tegafur-uracilo, capecitabina), análogos de citosina (por ejemplo, citarabina (ara C) citosina arabinósido y fludarabina), análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina y tioguanina), análogos de vitamina D3 (por ejemplo, EB 1089, CB 1093 y KH 1060), inhibidores de isoprenilación (por ejemplo, lovastatina), neurotoxinas dopaminérgicas (por ejemplo, ion 1-metil-4-fenilpiridinio), inhibidores del ciclo celular (por ejemplo, estaurosporina), actinomicina (por ejemplo, actinomicina D, dactinomicina), bleomicina (por ejemplo, bleomicina A2, bleomicina B2, peplomicina), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, doxorrubicina liposómica PEGilada, idarrubicina, epirrubicina, pirarrubicina, zorrubicina,

mitoxantrona), inhibidores de MDR (por ejemplo, verapamilo), inhibidores de Ca^{2+} ATPasa (por ejemplo, tapsigargina), imatinib, talidomida, lenalidomida, inhibidores de la tirosina quinasa (por ejemplo, axitinib (AG013736), bosutinib (SKI-606), cediranib (RECENTIN™, AZD2171), dasatinib (SPRYCEL®, BMS-354825), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRATESSA®) (Gleevec®, CGP57148B, STI-571), lapatinib (TYKERB®, TYVERB®), lestaurtinib (CEP-701), neratinib (HKI-272), nilotinib (TASIGNA®), semaxanib (semaxinib, SU5416), sunitinib (SUTENT®, SU11248), toceran®ib) (PALLADIA®ib) vandetanib (ZACTIMA®, ZD6474), vatalanib (PTK787, PTK/ZK), trastuzumab (HERCEPTIN®), bevacizumab (AVASTIN®), rituximab (RITUXAN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), ranibizumab (Lucentis®), nilotinib (TASIGNA®), sorafenib (NEXAVAR®), everolimus (AFINITOR®), alemtuzumab (CAMPATH®), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), temsirolimus (TORISEL®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, lactato de dovitinib (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, tivozanib (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647 y/o XL228), inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib (VELCADE®)), Inhibidores de mTOR (por ejemplo, rapamicina, temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD-001), ridaforolimus, AP23573 (Ariad), AZD8055 (AstraZeneca), BEZ235 (Novartis), BGT226 (Novartis), XL765 (Sanofi Aventis) -4691502 (Pfizer), GDC0980 (Genentech), SF1126 (Semafoe) y OSI-027 (OSI)), oblimersen, gemcitabina, carminomicina, leucovorina, pemetrexed, ciclofosfamida, dacarbazina, procarbizina, prednisolona, dexametasona, campatecina, plicamicina, asparaginasa, aminopterina, metopterina, porfiromicina, melfalán, leurosidina, leurosina, clorambucilo, trabectedina, procarbazina, discodermolida, carminomicina, aminopterina y hexametil melamina. También se pueden usar composiciones que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, FLAG, CHOP). FLAG comprende fludarabina, citosina arabinósido (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina y prednisona. En otra forma de realización, se utilizan inhibidores de PARP (por ejemplo, PARP-1 y/o PARP-2) y dichos inhibidores son bien conocidos en el arte (por ejemplo, Olaparib, ABT-888, BSI-201, BGP-15 (N- Gene Research Laboratories, Inc.); INO-1001 (Inotek Pharmaceuticals Inc.); PJ34 (Soriano y col., 2001; Pacher y col., 2002b); 3-aminobenzamida (Trevigen); 4-amino-1,8-naftalimida; (Trevigen); 6(5H)-fenantridinona

(Trevigen); benzamida (Patente de los EEUU Re. 36.397); y NU1025 (Bowman y col.). El mecanismo de acción está relacionado en general con la capacidad de los inhibidores de PARP de unirse a PARP y disminuir su actividad. PARP cataliza la conversión de dinucleótido de beta-nicotinamida y adenina (NAD+) a nicotinamida y poli-ADP-ribosa (PAR). Tanto la poli (ADP-ribosa) como PARP se han relacionado con la regulación de la transcripción, la proliferación celular, la estabilidad genómica y la carcinogénesis (Bouchard y col. (2003) *Exp. Hematol*. 31: 446-454); Herceg (2001) *Mut. Res.* 477: 97-110). La poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) es una molécula clave en la reparación de roturas de una sola hebra del ADN (SSB) (de Murcia J. y col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7303-7307; Schreiber y col. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 517-528; Wang y col. (1997) *Genes Dev.* 11: 2347-2358) El noqueo de la función de reparación de SSB mediante la inhibición de PARP1 induce roturas de doble hebra en el ADN (DSB) que pueden desencadenar la letalidad sintética en células cancerosas con reparación de DSB dirigida por homología defectuosa (Bryant y col. (2005) *Nature* 434: 913-917; Farmer y col. (2005) *Nature* 434: 917-921). Los ejemplos anteriores de agentes quimioterapéuticos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

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

En otra forma de realización, se usa terapia hormonal. Los tratamientos terapéuticos hormonales pueden comprender, por ejemplo, agonistas hormonales, antagonistas hormonales (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, tamoxifeno, raloxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON), antagonistas de LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y el procesamiento de hormonas, y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progestágenos), derivados de vitamina A (por ejemplo, ácido retinoico todo-trans (ATRA)); análogos de vitamina D3; antigestágenos (por ejemplo, mifepristona, onapristona) o antiandrógenos (por ejemplo, acetato de ciproterona).

En otra forma de realización, se usa hipertermia, un procedimiento en que el tejido corporal se expone a altas temperaturas (hasta 106 °F). El calor puede ayudar a reducir los tumores al dañar las células o al privarlas de las sustancias que necesitan para vivir. La terapia de hipertermia puede ser hipertermia local, regional y de cuerpo completo, utilizando dispositivos de calentamiento externos e internos. La hipertermia casi siempre se usa con otras formas de terapia (por ejemplo, radioterapia, quimioterapia y terapia biológica) en un intento de aumentar su eficacia. La hipertermia local se refiere al calor que se aplica a un área muy pequeña, por ejemplo, a un tumor. El área se puede calentar externamente con ondas de alta frecuencia dirigidas a un tumor desde un dispositivo externo al cuerpo. Para lograr el calentamiento interno, se puede utilizar uno de varios tipos de sondas estériles, que incluyen alambres delgados calientes o tubos huecos llenos de agua tibia; antenas de microondas implantadas; y electrodos de radiofrecuencia. En la hipertermia regional, se calienta un órgano o una extremidad. Se colocan imanes y dispositivos que producen alta energía sobre la región a calentar. En otro enfoque, que se denomina perfusión, se extrae parte de la sangre del paciente, se calienta y luego se bombea (perfunde) a la región que se va a calentar internamente. El calentamiento de cuerpo completo se usa para tratar el cáncer metastásico que se ha diseminado por todo el cuerpo. Se puede realizar utilizando mantas de agua tibia, cera caliente, bobinas inductivas (como las de las mantas eléctricas) o cámaras térmicas (similares a las incubadoras grandes). La hipertermia no causa ningún aumento marcado de los efectos secundarios o complicaciones de la radiación. Sin embargo, el calor aplicado directamente sobre la piel puede causar molestias o incluso un dolor local significativo en aproximadamente la mitad de los pacientes tratados. También puede causar ampollas, que

por lo general sanan rápidamente.

En otra forma de realización adicional, se usa la terapia fotodinámica (que también se denomina PDT, terapia de fotorradiación, fototerapia o fotoquimioterapia) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. La misma se basa en el descubrimiento de que ciertas sustancias químicas conocidas como agentes fotosensibilizantes pueden matar organismos unicelulares cuando los organismos se exponen a un tipo particular de luz. La PDT destruye las células cancerosas mediante el uso de una luz del láser de frecuencia fija en combinación con un agente fotosensibilizante. En la PDT, se inyecta el agente fotosensibilizante en el torrente sanguíneo y es absorbido por las células de todo el cuerpo. El agente permanece en las células cancerosas durante más tiempo que en las células normales. Cuando las células cancerosas tratadas se exponen a la luz del láser, el agente fotosensibilizante absorbe la luz y produce una forma activa de oxígeno que destruye las células cancerosas tratadas. La exposición a la luz se debe programar cuidadosamente para que ocurra cuando la mayor parte del agente fotosensibilizante haya salido de las células sanas pero aún esté presente en las células cancerosas. La luz del láser que se utiliza en la PDT puede dirigirse a través de una fibra óptica (una hebra de vidrio muy delgada). La fibra óptica se coloca cerca del cáncer para proveer la cantidad adecuada de luz. La fibra óptica se puede dirigir a través de un broncoscopio hacia los pulmones para el tratamiento del cáncer de pulmón o a través de un endoscopio hacia el esófago para el tratamiento del cáncer de esófago. Una ventaja de la TFD es que causa un daño mínimo al tejido sano. Sin embargo, debido a que la luz del láser que se usa actualmente no puede atravesar más de 3 centímetros de tejido (un poco más de una pulgada y un octavo), la PDT se usa principalmente para tratar tumores en la piel o debajo de ella o en el revestimiento de los órganos internos. La terapia fotodinámica hace que la piel y los ojos sean sensibles a la luz durante 6 semanas o más después del tratamiento. Se aconseja a los pacientes que eviten la luz solar directa y la luz interior brillante durante por lo menos 6 semanas. Si los pacientes deben salir al aire libre, deben usar ropa protectora, incluyendo gafas de sol. Otros efectos secundarios temporales de la PDT están relacionados con el tratamiento de áreas específicas y pueden incluir tos, dificultad para tragar, dolor abdominal y dolor al respirar o dificultad para respirar. En diciembre de 1995, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó un agente fotosensibilizante denominado porfímero sódico, o Photofrin®, para aliviar

los síntomas del cáncer de esófago que causa una obstrucción y para el cáncer de esófago que no puede ser tratado satisfactoriamente solo con láser. En enero de 1998, la FDA aprobó el porfímero sódico para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa temprana en pacientes en quienes no son apropiados los tratamientos habituales para el cáncer de pulmón. El Instituto Nacional del Cáncer [*National Cancer Institute*] y otras instituciones están apoyando ensayos clínicos (estudios de investigación) para evaluar el uso de la terapia fotodinámica para varios tipos de cáncer, que incluyen los tipos de cáncer de vejiga, cerebro, laringe y cavidad oral.

En otra forma de realización adicional, la terapia con láser se usa para utilizar luz de alta intensidad para destruir las células cancerosas. Esta técnica se usa frecuentemente para aliviar los síntomas del cáncer, tales como sangrado u obstrucción, especialmente cuando el cáncer no se puede curar con otros tratamientos. También se puede utilizar para tratar el cáncer reduciendo o destruyendo tumores. El término "láser" se refiere a amplificación de luz por emisión estimulada de radiación. La luz normal, por ejemplo, la de una lámpara, tiene muchas longitudes de onda y se propaga en todas las direcciones. Por otro lado, la luz del láser tiene una longitud de onda específica y se enfoca en un haz estrecho. Este tipo de luz de alta intensidad contiene mucha energía. Los láseres son muy potentes y se pueden usar para cortar acero o dar forma a diamantes. Los láseres también se pueden usar para trabajos quirúrgicos muy precisos, tales como reparar una retina dañada en el ojo o cortar tejidos (en lugar de un bisturí). Aunque hay varios tipos diferentes de láseres, solo tres tipos han ganado un amplio uso en la medicina: láser de dióxido de carbono (CO_2) - este tipo de láser puede eliminar capas delgadas de la superficie de la piel sin penetrar en las capas más profundas. Esta técnica es particularmente útil en el tratamiento de tumores que no se han diseminado profundamente en la piel y ciertas condiciones precancerosas. Como alternativa a la cirugía tradicional con bisturí, el láser de CO_2 también puede cortar la piel. El láser se utiliza de esta manera para eliminar tipos de cáncer de piel. Láser de neodimio: itrio-aluminio-granate (Nd:YAG) - la luz de este láser puede penetrar más profundamente en el tejido que la luz de los otros tipos de láser y puede hacer que la sangre se coagule rápidamente. Puede ser transportado a través de fibras ópticas a partes menos accesibles del cuerpo. Este tipo de láser se usa a veces para tratar tipos de cáncer de garganta. Láser de argón: este láser puede atravesar solo capas superficiales de tejido y, por lo tanto, es útil en dermatología y en cirugía

ocular. También se usa con tintes sensibles a la luz para tratar tumores en un procedimiento conocido como terapia fotodinámica (PDT). Los láseres tienen varias ventajas sobre las herramientas quirúrgicas estándar, algunas de las cuales son: Los láseres son más precisos que los bisturíes. Se protege el tejido cerca de una incisión, ya que hay poco contacto con la piel circundante u otro tejido. El calor producido por los láseres esteriliza el sitio de la cirugía, reduciendo así el riesgo de infección. Es posible que sea necesario un menor tiempo de operación porque la precisión del láser permite una incisión más pequeña. El tiempo de curación frecuentemente se acorta; dado que el calor del láser sella los vasos sanguíneos, hay menos sangrado, inflamación o cicatrización. La cirugía con láser puede ser menos complicada. Por ejemplo, con fibra óptica, se puede dirigir la luz del láser hacia determinadas partes del cuerpo sin hacer una incisión grande. Es posible realizar más procedimientos de manera ambulatoria. Los láseres se pueden usar de dos maneras para tratar el cáncer: reduciendo o destruyendo un tumor con calor, o activando una sustancia química, conocida como agente fotosensibilizante, que destruye las células cancerosas. En la PDT, un agente fotosensibilizante es retenido en las células cancerosas y puede ser estimulado por la luz para provocar una reacción que destruya las células cancerosas. Los láseres de CO_2 y Nd:YAG se utilizan para reducir o destruir tumores. Se pueden usar con endoscopios, tubos que permiten a los médicos ver ciertas áreas del cuerpo, tales como la vejiga. La luz de algunos láseres se puede transmitir a través de un endoscopio flexible equipado con fibra óptica. Esto permite que los médicos puedan ver y trabajar en partes del cuerpo que de otra manera serían inaccesibles excepto mediante cirugía y, por lo tanto, permite una orientación muy precisa del rayo láser. Los láseres también se pueden usar con microscopios de baja potencia, lo que le da al médico una clara visión del sitio que se está tratando. Utilizados con otros instrumentos, los sistemas láser pueden producir un área de corte tan pequeña como 200 micrones de diámetro, menor que el ancho de un hilo muy fino. Los láseres se utilizan para tratar muchos tipos de cáncer. La cirugía con láser es un tratamiento estándar para ciertas etapas de los tipos de cáncer de glotis (cuerdas vocales), cuello uterino, piel, pulmón, vagina, vulva y pene. Además de su uso para destruir el cáncer, la cirugía con láser también se usa para ayudar a aliviar los síntomas causados por el cáncer (cuidados paliativos). Por ejemplo, los láseres se pueden usar para reducir o destruir un tumor que está bloqueando la tráquea de un paciente, lo que facilita la respiración. También se utiliza a veces para paliar el cáncer colorrectal y anal.

La termoterapia intersticial inducida por láser (LITT) es uno de los desarrollos más recientes en la terapia con láser. En la LITT se usa la misma idea que en el tratamiento contra el cáncer denominado hipertermia; es decir, que el calor puede ayudar a reducir los tumores dañando las células o al privarlas de las sustancias que necesitan para vivir. En este tratamiento, se dirigen los láseres hacia áreas intersticiales (áreas entre órganos) del cuerpo. Luego, la luz del láser eleva la temperatura del tumor, lo que daña o destruye las células cancerosas.

En un aspecto, en la presente se provee un método para generar en un sujeto una respuesta inmunológica contra una célula que expresa un antígeno MAGEA1. En algunas formas de realización, el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que se describe en la presente, en donde la composición farmacéutica, cuando es administrada al sujeto, genera una respuesta inmunológica contra la célula que expresa un antígeno MAGEA1.

En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica puede incluir una respuesta inmunológica mediada por células. Una respuesta inmunológica celular es una respuesta que involucra células T y se puede determinar *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo.* Por ejemplo, una respuesta inmunológica celular general se puede determinar como la actividad proliferativa de células T en células (por ejemplo, leucocitos de sangre periférica (PBL)) tomadas de una muestra del sujeto en un momento adecuado después de administrar una composición farmacéutica. Después de una incubación, por ejemplo, de PBMC con un estimulante por un período apropiado, se puede determinar la incorporación de [^{3}H]timidina. El subconjunto de células T que está proliferando se puede determinar usando citometría de flujo.

En otro aspecto abarcado por la presente invención, los métodos que se proveen en la presente incluyen la administración a mamíferos humanos y no humanos según se describió anteriormente. También se contemplan aplicaciones veterinarias. En algunas formas de realización, el sujeto puede ser cualquier organismo vivo en el cual se pueda generar una respuesta inmunológica.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se puede administrar en cualquier momento que sea apropiado. Por ejemplo, la administración se puede conducir antes o durante el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1), y

se puede continuar después que el trastorno caracterizado por la expresión de un antígeno MAGEA1 se vuelva clínicamente indetectable. La administración también puede continuar en un sujeto que muestra signos de recurrencia.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se puede administrar como una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz. La administración de la composición farmacéutica al sujeto se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, y a dosificaciones y por períodos de tiempo suficientes como para lograr un efecto deseado.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se puede administrar al sujeto en cualquier sitio adecuado. La administración se puede lograr usando métodos generalmente conocidos en el arte. Los agentes, incluyendo a las células, pueden introducirse en el sitio deseado mediante inyección directa, o por cualquier otro medio utilizado en el arte, incluyendo, entre otros, la administración intravascular, intracerebral, parenteral, intraperitoneal, intravenoso, epidural, intraespinal, intraesternal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraarterial, intracardíaca o intramuscular. Por ejemplo, los sujetos de interés pueden injertarse con las células trasplantadas por diversas rutas. Dichas rutas incluyen, pero de manera no taxativa, a: administración intravenosa, administración subcutánea, administración a un tejido específico (por ejemplo, trasplante focal), inyección en la cavidad de la médula ósea del fémur, inyección en el bazo, administración debajo de la cápsula renal del hígado fetal, y otras similares. En cierta forma de realización, la vacuna contra el cáncer abarcada por la presente invención se inyecta al sujeto por vía intratumoral o subcutánea. Las células se pueden administrar en una infusión o mediante infusiones sucesivas durante un período de tiempo definido suficiente para generar un efecto que se desea. Algunos ejemplos de métodos para el trasplante, la evaluación del injerto y el análisis de fenotipado de marcadores de células trasplantadas son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Pearson y col. (2008) *Curr. Protoc. Immunol*. 81:15,21,1-15,21,21, Ito y col. (2002) *Blood* 100: 3175-3182; Traggiai y col. (2004) *Science* 304: 104-107; Ishikawa y col. *Blood* (2005) 106: 1565-1573; Shultz y col. (2005) *J. Immunol.* 174: 6477-6489; y Holyoake y col. (1999) *Exp. Hematol*. 27: 1418-1427).

En algunas formas de realización, la dosis se puede administrar en una y durante un período de tiempo eficaz para producir una respuesta que se desea, ya sea suscitando la respuesta inmunológica o mediante el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno caracterizado

por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1) y/o síntomas asociados con el mismo.

La composición farmacéutica se puede administrar después, antes o simultáneamente con otras terapias, que incluyen terapias que también generan una respuesta inmunológica en el sujeto. Por ejemplo, el sujeto se puede haber tratado antes o de manera concurrente con otras formas de agentes inmunomoduladores, donde dichas otras terapias se pueden proveer de manera tal que no interferirán con la inmunogenicidad de las composiciones que se describen en la presente.

La administración puede ser programada apropiadamente por el personal de salud (por ejemplo, médico, veterinario), y puede depender de la condición clínica del sujeto, los objetivos de administración y/o otras terapias que también están contempladas o administradas. En algunas formas de realización, se puede administrar una dosis inicial, y el sujeto será monitoreado por una respuesta inmunológica y/o clínica. Los medios adecuados para un monitoreo inmunológico incluyen emplear los linfocitos de sangre periférica (PBL) del paciente como respondedores y los péptidos inmunogénicos o complejos de péptido-MHC que se describen en la presente como estimulantes. Una reacción inmunológica también se puede determinar mediante una respuesta inflamatoria demorada en el sitio de la administración. Se puede administrar una o más dosis subsiguientes a la dosis inicial según fuera apropiado, típicamente en una base mensual, semimensual o semanal, hasta lograr el efecto deseado. A continuación, se pueden administrar dosis de refuerzo o de mantenimiento adicionales según necesidad, en particular cuando parece que el beneficio inmunológico o clínico está disminuyendo.

En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proveen las moléculas o células activas en una cantidad suficiente para proveer un beneficio. Dicha respuesta se puede controlar estableciendo un mejor resultado clínico (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia completa o parcial o más prolongada sin enfermedad) en los sujetos tratados en comparación con los sujetos no tratados. Los aumentos en las respuestas inmunológicas preexistentes a una proteína viral generalmente se correlacionan con un mejor resultado clínico. Dichas respuestas inmunológicas generalmente se pueden evaluar usando ensayos estándar de proliferación, citotoxicidad o citoquinas, que son de rutina.

Para uso profiláctico, una dosis debe ser suficiente para prevenir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de una enfermedad asociada con una enfermedad o trastorno. El beneficio profiláctico de las composiciones inmunogénicas administradas de acuerdo con los métodos que se describen en la presente se puede determinar realizando estudios preclínicos (incluyendo estudios *in vitro, ex vivo* e *in vivo* en animales) y clínicos y analizando los datos que se obtienen de los mismos mediante métodos estadísticos, biológicos y métodos y técnicas clínicos, todos los cuales pueden ser llevados a la práctica fácilmente por un especialista en el arte.

Tal como se usa en la presente, la administración de una composición se refiere a administrar la misma a un sujeto, independientemente de la ruta o el modo de administración. La administración se puede realizar de manera continua o intermitente y parenteral. La administración puede ser para tratar a un sujeto que ya se ha confirmado que tiene una afección, enfermedad o estado patológico reconocido, o para tratar a un sujeto susceptible o en riesgo de desarrollar tal afección, enfermedad o estado patológico. La coadministración con una terapia coadyuvante puede incluir la administración simultánea y/o en secuencia de múltiples agentes en cualquier orden y según cualquier calendario de dosificación (por ejemplo, células inmunológicas modificadas con una o más citoquinas; terapia inmunosupresora como inhibidores de calcineurina, corticosteroides, inhibidores de microtúbulos, dosis bajas de un profármaco de ácido micofenólico, o cualquier combinación de los mismos).

En algunas formas de realización, se administra al sujeto una pluralidad de dosis de una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica modificada) según se describe en la presente, que se puede administrar con intervalos entre las administraciones de entre aproximadamente dos y aproximadamente cuatro semanas.

Los métodos de tratamiento o prevención que abarca la presente invención se pueden administrar a un sujeto como parte de un curso o régimen de tratamiento, que puede comprender tratamientos adicionales antes o después de la administración de las dosis unitarias, células o composiciones que se describen en la presente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un sujeto que recibe una dosis unitaria de la célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica modificada) está recibiendo o había recibido previamente un trasplante de células hematopoyéticas (HCT, por las siglas en inglés de *Hematopoietic Cell*

Transplant; incluyendo HCT mielosupresores y no mielosupresores). En cualquiera de las anteriores formas de realización, una célula hematopoyética que se utiliza en un HCT puede ser una célula de "donante universal" que se modifica para reducir o eliminar la expresión de uno o más genes endógenos que codifican un producto polipeptídico seleccionado de un MHC, un antígeno y una proteína de unión (por ejemplo, mediante un noqueo cromosómico de un gen de acuerdo con los métodos que se describen en la presente).

Las técnicas y regímenes para realizar el trasplante de células se conocen en el arte y pueden comprender el trasplante de cualquier célula donante adecuada, tal como una célula derivada de sangre de cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica, una célula madre hematopoyética, una célula madre movilizada o una célula del líquido amniótico. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una célula huésped (por ejemplo, una célula inmunológica modificada) abarcada por la presente invención se puede administrar con la terapia con células madre o poco después de la misma.

Los métodos abarcados por la presente invención pueden incluir además, en algunas formas de realización, la administración de uno o más agentes adicionales para tratar la enfermedad o el trastorno (por ejemplo, un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 tal como un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1) en una terapia combinada. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una terapia de combinación comprende administrar (al mismo tiempo, simultáneamente o en secuencia) la célula huésped o la proteína de unión abarcada por la presente invención con un agente antiviral. En algunas formas de realización, una terapia de combinación comprende administrar una célula huésped o proteína de unión abarcada por la presente invención con lopinavir/ritonavir, cloroquina, ribavirina, fármacos esteroides, hidroxicloroquina y/o interferón α. En algunas formas de realización, una terapia de combinación comprende administrar una célula huésped, composición o dosis unitaria de las células huésped abarcadas por la presente invención con una terapia secundaria, tal como una cirugía, un anticuerpo, una vacuna o cualquier combinación de las mismas.

En algunas formas de realización, el sujeto es un humano, tal como un ser humano que padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo

caracterizado por la expresión de MAGEA1). En algunas formas de realización, el sujeto es un roedor, por ejemplo, un ratón. En algunas de tales formas de realización, el ratón es un ratón transgénico, tal como un ratón que expresa moléculas del MHC humano (es decir, HLA) tales como HLA-A2 (por ejemplo, Nicholson y col. (2012) Adv. Hematol. 2012: 404081).

En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa TCR humanos o es un ratón antígeno negativo (por ejemplo, Li y col. (2010) Nat. Med. 16: 1029-1034 y Obenaus y col. (2015) Nat. Biotechnol 33: 402-407). En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa moléculas de la HLA humanas y TCR humanos.

En algunas formas de realización, tal como donde el sujeto es un ratón transgénico para HLA, se modifican los TCR identificados, por ejemplo, para que sean quiméricos o humanizados. En algunas formas de realización, el andamiaje de TCR se ha modificado, de manera análoga a los métodos conocidos de humanización de proteínas de unión.

c. Métodos de selección

Otro aspecto que abarca la presente invención abarca ensayos de selección.

En algunas formas de realización, se proveen métodos para seleccionar agentes que se unen a un péptido inmunogénico MAGEA1 o pMHC según se describe en la presente. Por ejemplo, se provee un método para identificar una molécula de unión a péptido, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que se une a un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1 que comprende: a) proveer una célula que presenta un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1 en el contexto de una molécula de MHC sobre la superficie de la célula; b) determinar la unión de una pluralidad de moléculas de unión a péptido candidatas, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, al epítopo peptídico en el contexto de la molécula de MHC sobre la célula; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptido, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, que se unen al epítopo peptídico en el contexto de la molécula de MHC.

En algunas formas de realización, se provee un método para identificar una molécula de unión a péptido, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que se une a un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos que se enumeran en la Tabla 1 que comprende: a) proveer un epítopo peptídico ya sea solo o en un complejo de MHC-péptido estable, que comprende un epítopo peptídico seleccionado entre las secuencias de péptidos

que se enumeran en la Tabla 1, ya sea solo o en el contexto de una molécula de MHC; b) determinar la unión de una pluralidad de moléculas de unión a péptido candidatos, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, al péptido o complejo de MHC-péptido estable; y c) identificar una o más moléculas de unión a péptido, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, que se unen al epítopo peptídico o al complejo de MHC-péptido estable, opcionalmente en donde el MHC o el complejo de MHC-péptido es como se describe en la presente.

En algunas formas de realización, en la presente se proveen métodos para identificar una molécula de unión a péptido o fragmento de unión a antígeno de la misma, que se une a un epítopo peptídico seleccionado de la Tabla 1.

En algunas formas de realización, la molécula de unión a péptido, por ejemplo, la molécula de unión del MHC-péptido, es una molécula o una porción de la misma que tiene la capacidad de unirse, por ejemplo, de unirse de manera específica y/o selectiva, a un epítopo peptídico que se presenta o expresa en el contexto de una molécula del MHC (complejo de MHC-péptido), tal como sobre la superficie de una célula. Los ejemplos de moléculas de unión a péptido incluyen receptores de célula T o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, inclusive regiones variables de inmunoglobulina de cadena simple (por ejemplo, scTCR, scFv) de los mismos, que muestren una capacidad específica para unirse a un complejo de MHC-péptido. En algunas formas de realización, la molécula de unión a péptido es un TCR o fragmento de unión a antígeno de la misma. En algunas formas de realización, la molécula de unión a péptido es un anticuerpo, tal como un anticuerpo tipo TCR o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, la molécula de unión a péptido es un CAR tipo TCR que contiene un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un anticuerpo tipo TCR, tal como uno que ha sido modificado para unirse a complejos de MHC-péptido. En algunas formas de realización, la molécula de unión a péptido puede derivar de fuentes naturales, o se puede producir en parte o por completo de manera sintética o recombinante.

En algunas formas de realización, una molécula de unión que se une a un epítopo peptídico se puede identificar mediante contacto de una o más moléculas de unión a péptido candidato, tal como una o más moléculas de TCR candidato, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, con un complejo de MHC-péptido, y evaluación de si cada de dichas

una o más moléculas de unión candidato se unen (por ejemplo, de manera específica y/o selectiva) al complejo de MHC-péptido. Los métodos se pueden emplear *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Los métodos para el cribado son bien conocidos en el arte, tal como se describe en la publicación de la Patente de los EEUU Nº: 2020/0102553.

En algunas formas de realización, los métodos incluyen el contacto de una pluralidad o biblioteca de moléculas de unión, tal como una pluralidad o biblioteca de TCR o anticuerpos, con un epítopo restringido a MHC y la identificación o selección de las moléculas que se unen de manera específica y/o selectiva a dicho epítopo. En algunas formas de realización, se puede examinar y seleccionar una biblioteca o colección que contiene una pluralidad de moléculas de unión diferentes, tal como una pluralidad de TCR diferentes o una pluralidad de anticuerpos diferentes, por su unión a un epítopo restringido a MHC. En algunas formas de realización, tal como para seleccionar una proteína de unión que se une de manera específica y/o selectiva a un péptido restringido a MHC, se pueden emplear métodos de hibridoma.

En algunas formas de realización, se pueden emplear métodos de cribado en los cuales una pluralidad de moléculas de unión candidato, tal como una biblioteca o colección de moléculas de unión candidato, se pone en contacto de manera individual con una molécula de unión a péptido, ya sea de manera simultánea o sucesiva. Se pueden identificar o seleccionar los miembros de la biblioteca que se unen de manera específica y/o selectiva a un complejo de MHC-péptido particular. En algunas formas de realización, la biblioteca o colección de moléculas de unión candidato puede contener por lo menos 2, 5, 10, 100, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 o más moléculas de unión a péptido diferentes.

En algunas formas de realización, los métodos se pueden emplear para identificar una molécula de unión a péptido, tal como un TCR o un anticuerpo, que presenta unión a más de un haplotipo de MHC o más de un alelo de MHC. En algunas formas de realización, la molécula de unión a péptido, tal como un TCR o anticuerpo, se une o reconoce de manera específica y/o selectiva un epítopo peptídico presentado en el contexto de una pluralidad de haplotipos o alelos de MHC de clase I. En algunas formas de realización, la molécula de unión a péptido, tal como un TCR o anticuerpo, se une o reconoce de manera específica y/o selectiva un epítopo peptídico presentado en el contexto de una pluralidad de haplotipos o alelos de MHC de clase II.

Hay una variedad de ensayos que son conocidos para evaluar la afinidad de unión y/o

determinar si una molécula de unión se une de manera específica y/o selectiva a un ligando particular (por ejemplo, el complejo de MHC-péptido). Es propio del nivel de un experto en el arte determinar la afinidad de unión de un TCR por un epítopo de célula T de un polipéptido diana, tal como mediante el uso de cualquiera de numerosos de ensayos de unión que son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede usar un equipo Biacore® para determinar la constante de unión de un complejo entre dos proteínas. La constante de disociación (K_D) del complejo se puede determinar mediante monitoreo de los cambios en el índice de refracción con respecto al tiempo que una solución amortiguadora pasa sobre el chip. Otros ensayos adecuados para medir la unión de una proteína a otra incluyen, por ejemplo, inmunoensayos tales como un ensayo de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA), o determinación de la unión mediante monitoreo del cambio en las propiedades espectroscópicas u ópticas de las proteínas por medio de fluorescencia, absorción UV, dicroísmo circular o resonancia magnética nuclear (RMN). Otros ejemplos de ensayos incluyen, pero en un sentido no taxativo, transferencia Western, ELISA, ultracentrifugación analítica, espectroscopía y análisis mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore®) (véase, por ejemplo, Scatchard y col., (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660, Wilson (2002) *Science* 295: 2103, Wolff y col., (1993) *Cancer Res.,* 53: 2560, y las Patentes de los EEUU N°: 5.283.173 y 5.468.614 o equivalentes), citometría de flujo, secuenciación y otros métodos de detección de ácidos nucleicos expresados. En un ejemplo, se mide la afinidad aparente por un TCR mediante evaluación de la unión a varias concentraciones de tetrámeros, por ejemplo, mediante citometría de flujo usando tetrámeros marcados. En un ejemplo, la K_D aparente de un TCR se mide usando diluciones 2X de tetrámeros marcados en un rango de concentraciones, seguido por determinación de las curvas de unión mediante regresión no lineal, donde la K_D aparente se determina como la concentración del ligando que dio como resultado la unión medio máxima.

En algunas formas de realización, los métodos se pueden usar para identificar moléculas de unión que solo se unen si el péptido particular está presente en el complejo, y no si dicho péptido particular está ausente o si hay otro péptido no superpuesto o no relacionado. En algunas formas de realización, la molécula de unión no se une sustancialmente al MHC en la ausencia del péptido unido, y/o sustancialmente no se une al péptido en la ausencia del MHC. En algunas formas de realización, las moléculas de unión son por lo menos parcialmente

específicas. En algunas formas de realización, un ejemplo de una molécula de unión identificada se puede unir a un complejo de MHC-péptido si el péptido particular está presente, y también se puede unir si un hay péptido relacionado que tiene una o dos sustituciones relativas al péptido particular.

En algunas formas de realización, se puede usar un anticuerpo identificado, tal como un anticuerpo tipo TCR, para producir o generar receptores de antígenos quiméricos (CAR) que contienen un anticuerpo no anti-TCR que se une de manera específica y/o selectiva a un complejo de MHC-péptido.

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

En algunas formas de realización, las bibliotecas de TCR se pueden generar mediante amplificación del repertorio de Vα y Vβ de las células T aisladas de un sujeto, incluyendo las células presentes en PBMC, bazo u otro órgano u otro órgano linfoide. En algunos casos, las células T se pueden amplificar a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). En algunas formas de realización, las bibliotecas de TCR se pueden generar a partir de células CD4+ o CD8+. En algunas formas de realización, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de células T de un sujeto normal o sano, es decir, bibliotecas de TCR normales. En algunas formas de realización, los TCR se pueden amplificar a partir de una fuente de células T de un sujeto enfermo, es decir, bibliotecas de TCR de enfermos. En algunas formas de realización,

se usan cebadores degenerados para amplificar el repertorio genético de Vα y VP, tal como mediante RT-PCR en muestras, tales como de células T, obtenidas de humanos. En algunas formas de realización, se pueden ensamblar bibliotecas de scTv a partir de bibliotecas de Vα y Vβ naive en donde los productos amplificados se clonan o se ensamblan separados por un conector. Dependiendo de la fuente del sujeto y las células, las bibliotecas pueden ser específicas de un alelo de HLA.

Como alternativa, en algunas formas de realización, las bibliotecas de TCR se pueden generar mediante mutagénesis o diversificación de una molécula de TCR parental o de andamiaje. Por ejemplo, en algunos aspectos, se puede vacunar a un sujeto, por ejemplo, un humano u otro mamífero, tal como un roedor, con un péptido, tal como un péptido identificado mediante los métodos de la presente. En algunas formas de realización, se puede obtener una muestra del sujeto, tal como una muestra que contiene linfocitos sanguíneos. En algunos casos, las moléculas de unión, por ejemplo, TCR, se pueden amplificar a partir de la muestra, por ejemplo, células T contenidas en la muestra. En algunas formas de realización, se pueden seleccionar células T específicas del antígeno, tal como mediante cribado para evaluar la actividad CTL contra el péptido. En algunos aspectos, se pueden seleccionar los TCR, por ejemplo, los que están presentes sobre las células T específicas del antígeno, tal como por la actividad de unión, por ejemplo, por una afinidad o avidez particular por el antígeno. En algunos aspectos, los TCR son sometidos a una evolución dirigida, tal como mediante mutagénesis, por ejemplo, de la cadena α o β. En algunos aspectos, se alteran residuos particulares dentro de las CDR del TCR. En algunas formas de realización, los TCR seleccionados se pueden modificar mediante maduración por afinidad. En algunos aspectos, se puede usar un TCR seleccionado como un TCR de andamiaje parental contra el antígeno.

En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano, tal como un humano con un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En algunas formas de realización, el sujeto es un roedor, por ejemplo, un ratón. En algunas de tales formas de realización, el ratón es un ratón transgénico, tal como un ratón que expresa moléculas del MHC humano (es decir, HLA) tales como HLA-A2 (por ejemplo, Nicholson y col. (2012) Adv. Hematol. 2012: 404081).

En algunas formas de realización, el sujeto es un ratón transgénico que expresa TCR humano o es un ratón antígeno negativo (por ejemplo, Li y col. (2010) Nat. Med. 161029: 1029-1034 y Obenaus y col. (2015) Nat. Biotechnol 33: 402-407). En algunas formas de realización, el

sujeto es un ratón transgénico que expresa moléculas de la HLA humanas y TCR humanos.

En algunas formas de realización, tal como donde el sujeto es un ratón transgénico para HLA, se modifican los TCR identificados, por ejemplo, para que sean quiméricos o humanizados. En algunos aspectos, se modifica en andamiaje de TCR, tal como de manera análoga a los métodos de humanización de anticuerpos conocidos.

En algunas formas de realización, dicha molécula de andamiaje se usa para generar una biblioteca de TCR.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, la biblioteca incluye TCR o porciones de unión a antígeno de los mismos que han sido modificados o manipulados en comparación con la molécula de TCR parental o de andamiaje. En algunas formas de realización, se pueden usar métodos de evolución dirigida para generar TCR con propiedades alteradas, tal como con una mayor afinidad por un complejo de MHC-péptido específico. En algunas formas de realización, los enfoques de presentación comprenden manipular, o modificar, un TCR conocido, parental o de referencia. Por ejemplo, en algunos casos, se puede usar un TCR de tipo salvaje como molde para producir TCR mutados en los cuales están mutados uno o más residuos de las CDR, y se seleccionan los mutantes con una propiedad alterada deseada, tal como una mayor afinidad por un antígeno diana deseado. En algunas formas de realización, la evolución dirigida se efectúa mediante métodos de presentación que incluyen, pero en un sentido no taxativo, presentación en levadura (Holler y col., (2003) *Nat Immunol* 4: 55-62; Holler y col., (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5387-5392), presentación en fagos (Li y col., (2005) *Nat Biotechnol* 23: 349-354) o presentación en células T (Chervin y col., (2008) *J Immunol Methods* 339: 175-184).

En algunas formas de realización, las bibliotecas pueden ser solubles. En algunas formas de realización, las bibliotecas son bibliotecas de expresión en las cuales el TCR se presenta sobre la superficie de un fago o de una célula, o unido a una partícula o molécula, tal como una célula, ribosoma o ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN. Típicamente, las bibliotecas de TCR, que incluyen bibliotecas de TCR normales y de la enfermedad o bibliotecas diversificadas, se pueden generar de cualquier forma, inclusive como un heterodímero o como una forma de cadena simple. En algunas formas de realización, uno o más miembros del TCR puede ser un heterodímero de dos cadenas. En algunas formas de realización, se puede promover el apareamiento de las cadenas Vα y Vβ mediante introducción de un enlace

disulfuro. En algunas formas de realización, los miembros de la biblioteca de TCR pueden comprender una sola cadena de TCR (scTv o ScTCR), que, en algunos casos, pueden incluir una cadena Vα y Vβ separadas por un conector. Además, en algunos casos, después del cribado y selección de un TCR de la biblioteca, el miembro seleccionado se puede generar en cualquier forma, tal como un heterodímero de longitud completa de TCR o una forma de cadena simple o como fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

También se describen otros métodos para identificar moléculas que se unen a un péptido en el contexto de una molécula de MHC en la Solicitud de Patente de los EEUU N°: 2020/0182884.

De manera más lo general, la presente invención abarca ensayos para agentes de selección, tales como proteínas de prueba, que se unen a MAGEA1 o a un antígeno del mismo o modulan su actividad. Dichos agentes incluyen, de manera no taxativa, anticuerpos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, el método para identificar un agente que modula una respuesta inmunológica determinar la capacidad del agente candidato de modular la actividad de MAGEA1 y modular adicionalmente una respuesta inmunitaria de interés, tal como la activación y/o actividad de células T citotóxicas moduladas, la sensibilidad de células cancerosas a la terapia de punto de control inmunitario, y otros similares.

En algunas formas de realización, el ensayo es un ensayo sin células o un ensayo basado en células, que comprende poner en contacto a una diana con un agente de prueba y determinar la capacidad del agente de prueba de modular (por ejemplo, aumentando o disminuyendo la expresión) la cantidad y/o la actividad de la diana, por ejemplo, midiendo parámetros directos o indirectos como se describe a continuación.

En algunas formas de realización, el ensayo es un ensayo basado en células, por ejemplo, uno que comprende poner en contacto (a) una célula de interés con un agente de prueba y determinar la capacidad del agente de prueba de modular la cantidad y/o la actividad de la diana, por ejemplo, sus características de unión. La determinación de la capacidad de los polipéptidos de unirse o interactuar entre sí se puede realizar, por ejemplo, midiendo la unión directa o midiendo un parámetro de activación de las células inmunitarias o una función de las mismas.

En otra forma de realización, el ensayo es un ensayo basado en células, que comprende

poner en contacto una célula tal como una célula cancerosa con células inmunitarias (por ejemplo, células T citotóxicas) y un agente de prueba, y determinar la capacidad del agente de prueba de modular la cantidad y/o actividad de la diana, y/o respuestas inmunitarias moduladas, por ejemplo, midiendo parámetros directos o indirectos según se describe más adelante.

Los métodos descritos anteriormente y en la presente también se pueden adaptar para probar uno o más agentes que ya se sabe que modulan la cantidad y/o la actividad de uno o más biomarcadores que se describen en la presente para confirmar la modulación de uno o más biomarcadores y/o para confirmar la efectos de los agentes sobre las lecturas de un fenotipo deseado, tales como respuestas inmunitarias moduladas, sensibilidad al bloqueo del punto de control inmunitario y otros similares.

En un ensayo de unión directa, la proteína biomarcadora (o sus respectivos polipéptidos o moléculas diana) se puede acoplar con un radioisótopo o marcador enzimático de manera que se pueda determinar la unión detectando la proteína o molécula marcada en un complejo. Por ejemplo, las dianas se pueden marcar con ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C o ^{3}H, de manera directa o indirecta, y el radioisótopo será detectado mediante conteo directo de la radioemisión o mediante conteo de centelleo. Como alternativa, las dianas se pueden marcar enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la marca enzimática se detecta mediante determinación de una conversión apropiada de sustrato a producto. La determinación de la interacción entre la diana y el sustrato también se puede realizar utilizando ensayos de análisis enzimático o de unión estándar. En una o más formas de realización de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser deseable inmovilizar polipéptidos o moléculas para facilitar la separación de formas complejadas de otras formas no complejadas de una o ambas proteínas o moléculas, así como para acomodar la automatización del ensayo.

La unión de un agente de prueba a una diana se puede realizar en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos no taxativos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. Las formas inmovilizadas de los anticuerpos que abarca la presente invención también pueden incluir anticuerpos unidos a una fase sólida, por ejemplo, un material poroso, microporoso (con un diámetro medio de poro menor de una micrón) o macroporoso (con un diámetro medio de

poro mayor de unas 10 micrones), por ejemplo, una membrana, celulosa, nitrocelulosa o fibras de vidrio; una perla, por ejemplo, de agarosa o poliacrilamida o látex; o una superficie de un plato, una placa o pocillo hecho, por ejemplo, de poliestireno.

Por ejemplo, en un ensayo de unión directa, los polipéptidos se pueden acoplar con un radioisótopo o marcador enzimático de manera que se puedan determinar las interacciones y/o la actividad polipeptídica, tal como los eventos de unión, detectando la proteína marcada en un complejo. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden marcar con ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C o ^{3}H, de manera directa o indirecta, y el radioisótopo será detectado mediante conteo directo de la radioemisión o mediante conteo de centelleo. Como alternativa, los polipéptidos se pueden marcar enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y la marca enzimática se detecta mediante determinación de una conversión apropiada de sustrato a producto.

También se encuentra dentro del alcance de la presente invención la determinación de la capacidad de un agente de modular un parámetro de interés sin marcar ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, se puede utilizar un microfisiómetro para detectar la interacción entre polipéptidos sin marcar los polipéptidos a controlar (McConnell y col. (1992) *Science* 257:1906-1912). Tal como se lo usa en la presente, un "microfisiómetro" (por ejemplo, un instrumento Cytosensor®) es un instrumento analítico que mide la velocidad con que una célula acidifica su entorno utilizando un sensor potenciométrico direccionable por luz (LAPS). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden utilizar como un indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

En algunas formas de realización, la determinación de la capacidad de un agente de prueba (por ejemplo, anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) de modular la interacción entre un determinado conjunto de polipéptidos se puede realizar determinando la actividad de uno o más miembros del conjunto de polipéptidos. Por ejemplo, la actividad de una proteína y/o uno o más compañeros de unión se puede determinar detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, señalización intracelular), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen informante (que comprende un elemento regulador que responde a la diana unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectando una respuesta celular regulada por la proteína

y/o uno o más compañeros de unión. La determinación de la capacidad del agente de prueba de unirse o interactuar con dicho polipéptido se puede lograr, por ejemplo, midiendo la capacidad de un compuesto de modular la coestimulación o inhibición de células inmunológicas en un ensayo de proliferación, o interfiriendo con la capacidad de dicho polipéptido de unirse a anticuerpos que reconocen una parte de los mismos.

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

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

Como alternativa, los agentes que abarca la presente invención se pueden probar para determinar la capacidad de modular la producción celular de citoquinas que son producidas por células inmunológicas o cuya producción se potencia o inhibe en las mismas, en respuesta a la modulación de uno o más biomarcadores. Las citoquinas indicativas liberadas por las células inmunológicas de interés se pueden identificar mediante ELISA o por la capacidad de un anticuerpo que bloquea la citoquina de inhibir la proliferación de células inmunológicas o la proliferación de otros tipos de células inducida por la citoquina, según se

describe en la sección de Ejemplos. También se puede usar un ensayo de coestimulación de células inmunológicas *in vitro* en un método para identificar citoquinas que se pueden modular mediante la modulación de uno o más biomarcadores. Por ejemplo, si una actividad particular inducida por la coestimulación, por ejemplo, la proliferación de células inmunológicas, no puede inhibirse mediante el agregado de anticuerpos bloqueadores a citoquinas conocidas, la actividad puede ser el resultado de la acción de una citoquina desconocida. Después de la coestimulación, esta citoquina se puede purificar del medio mediante métodos convencionales y su actividad se puede medir por su capacidad de inducir la proliferación de células inmunológicas. Para identificar las citoquinas que pueden desempeñar un papel en la inducción de tolerancia, se puede usar un ensayo de coestimulación de células T *in vitro* según se describió anteriormente. En este caso, las células T recibirían la señal de activación primaria y se pondrían en contacto con una citoquina seleccionada, pero no recibirían la señal coestimulante. Después de lavar y dejar en reposo las células inmunológicas, las células se volverán a exponer tanto a una señal de activación primaria como a una señal coestimulante. Si las células inmunológicas no responden (por ejemplo, si proliferan o producen citoquinas), se han tolerizado y la citoquina no ha impedido la inducción de tolerancia. Sin embargo, si las células inmunológicas responden, la citoquina ha impedido la inducción de tolerancia. Aquellas citoquinas que son capaces de prevenir la inducción de tolerancia se pueden dirigir para realizar un bloqueo *in vivo* junto con reactivos que bloquean antígenos de linfocitos B como un medio más eficaz de inducir tolerancia en receptores de trasplantes o sujetos con enfermedades autoinmunes.

En algunas formas de realización, un ensayo abarcado por la presente invención es un ensayo libre de células para la selección de agentes que modulan la interacción entre un biomarcador y/o uno o más compañeros de unión, que comprende poner en contacto un polipéptido y uno o más compañeros de unión naturales, o una parte biológicamente activa de los mismos, con un agente de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba de modular la interacción entre el polipéptido y uno o más compañeros de unión naturales, o una parte biológicamente activa de los mismos. La unión del compuesto de prueba se puede determinar directa o indirectamente según se describió anteriormente. En una forma de realización, el ensayo incluye poner en contacto al polipéptido, o una parte biológicamente activa del mismo, con su compañero de unión para formar una mezcla de ensayo, poner en

contacto a la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del agente de ensayo de interactuar con el polipéptido en la mezcla de ensayo, donde la determinación de la capacidad del agente de prueba de interactuar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del agente de prueba de unirse preferentemente al polipéptido o a una parte biológicamente activa del mismo, en comparación con el compañero de unión.

En algunas formas de realización, ya sea para ensayos basados en células o libres de células, se puede analizar un agente de prueba para determinar si afecta la unión y/o la actividad de la interacción entre el polipéptido y uno o más compañeros de unión, con otros compañeros de unión. Otros métodos de análisis de unión útiles incluyen el uso de Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) en tiempo real (Sjolander y Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345 y Szabo y col. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705). Tal como se usa en la presente, "BIA" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, Biacore®). Se pueden usar los cambios en el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR) como una indicación de las reacciones en tiempo real entre polipéptidos biológicos. Los polipéptidos de interés se pueden inmovilizar en un chip Biacore® y se pueden probar múltiples agentes (anticuerpos de bloqueo, proteínas de fusión, péptidos o moléculas pequeñas) para determinar la unión al polipéptido de interés. Un ejemplo del uso de la tecnología BIA se describe en Fitz y col. (1997) *Oncogene* 15: 613.

Los ensayos libres de células que abarca la presente invención son apropiados para usar formas de proteínas tanto solubles como unidas a membranas. En el caso de ensayos libres de células en los que se usa una proteína en la forma unida a membrana, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de manera que la forma unida a membrana de la proteína se mantenga en solución. Algunos ejemplos de dichos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecipoli(éter de etilenglicol)$_n$, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO), o N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano sulfonato.

En una o más formas de realización de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede

ser deseable inmovilizar cualquiera de los polipéptidos para facilitar la separación de las formas complejadas de las no complejadas de una o ambas proteínas, así como para adaptar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a un polipéptido se puede lograr en cualquier recipiente apropiado para contener los reactivos. Algunos ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una forma de realización, se puede proveer una proteína de fusión que agrega un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, se pueden adsorber proteínas de fusión de polipéptidos a base de glutatión-S-transferasa, o las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/diana, sobre perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivadas de glutatión, que luego se combinan con el compuesto de prueba y la mezcla se incuba en condiciones propicias para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de salinidad y pH). Después de la incubación, las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, en el caso de las perlas la matriz se inmoviliza, y el complejo se determina directa o indirectamente, por ejemplo, según se describió anteriormente. Como alternativa, los complejos pueden disociarse de la matriz y se puede determinar el nivel de unión o actividad de polipéptido usando técnicas estándar.

La presente invención se refiere además a nuevos agentes identificados mediante los ensayos de selección descritos anteriormente. Por lo tanto, el uso adicional de un agente identificado según se describe en la presente en un sistema modelo apropiado se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, un agente identificado según se describe en la presente se puede usar en un sistema modelo para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Como alternativa, un agente identificado según se describe en la presente se puede usar en un sistema modelo para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Además, la presente invención se refiere a usos de agentes novedosos identificados por los ensayos de selección descritos anteriormente para tratamientos según se describe en la presente.

d. Medicina predictiva

La presente invención también se relaciona con el campo de la medicina predictiva en el que se utilizan ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico y ensayos clínicos de seguimiento

con fines de pronóstico (predictivos) para tratar profilácticamente a un individuo. Por lo tanto, un aspecto que abarca la presente invención abarca ensayos de diagnóstico para determinar (por ejemplo, detectar) la presencia, ausencia, cantidad y/o nivel de actividad de MAGEA1 o reactividad a MAGEA1 en el contexto de una muestra biológica (por ejemplo, de sangre, suero, células o tejido) para determinar de esta manera si es probable que un individuo afectado por un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 responda a la terapia, ya sea en un estado original o como recurrencia. Dichos ensayos se pueden utilizar con fines de pronóstico o predictivos para tratar profilácticamente a un individuo antes del inicio o después de la recurrencia de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

Los métodos de diagnóstico que se describen en la presente además se pueden utilizar para identificar a sujetos que padecen o que tienen riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1, o falta de la misma. Tal como se lo usa en la presente, el término "aberrante" incluye el aumento o la disminución de la expresión de MAGEA1 desde los niveles normales. La expresión o actividad aberrante incluye la expresión o actividad aumentada o disminuida, así como una expresión o actividad que no sigue el patrón de desarrollo normal de la expresión o el patrón de expresión subcelular. Por ejemplo, es la intención que los niveles aberrantes incluyan los casos en los que una mutación en el gen del biomarcador o la secuencia reguladora, o la amplificación del gen cromosómico, provoca el aumento o la disminución de la expresión del biomarcador de interés. Tal como se lo usa en la presente, el término "no deseado" incluye a un fenómeno no deseado relacionado con una respuesta biológica, tal como la actividad de las células inmunitarias.

Los ensayos que se describen en la presente, tales como los ensayos de diagnóstico precedentes o los ensayos que se describen a continuación, se pueden utilizar para identificar a un sujeto que padece o que tiene riesgo de desarrollar un trastorno asociado con una regulación defectuosa de MAGEA1. Por lo tanto, la presente invención provee un método para identificar un trastorno asociado con la regulación aberrante o no deseada de MAGEA1 en el que se obtiene una muestra de prueba de un sujeto y se detecta la expresión de MAGEA1, donde la presencia de la expresión de MAGEA1 es diagnóstico de que el sujeto padece el trastorno asociado con la expresión aberrante o no deseada de MAGEA1 o está en riesgo de desarrollarlo. Tal como se lo usa en la presente, una "muestra de prueba" se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de prueba

puede ser un fluido biológico (por ejemplo, fluido cerebroespinal o suero), una muestra celular o un tejido, por ejemplo, un portaobjetos histopatológico del microambiente tumoral, el área peritumoral y/o el área intratumoral.

Además, los ensayos de pronóstico que se describen en la presente se pueden utilizar para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente que se describe en la presente para tratar dicho trastorno asociado con la expresión aberrante o no deseada de MAGEA1. Por ejemplo, dichos métodos se pueden utilizar para determinar si un sujeto se puede tratar de manera efectiva con un agente o con una combinación de agentes. Por lo tanto, la presente invención provee métodos para determinar si un sujeto se puede tratar eficazmente con uno o más agentes de los que se describen en la presente para tratar un trastorno asociado con la expresión aberrante o no deseada de MAGEA1.

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

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

e. Seguimiento de los efectos durante los ensayos clínicos

El monitoreo de la influencia de un trastorno caracterizado por la terapia de expresión de MAGEA1 (por ejemplo, compuestos, fármacos, vacunas, terapias celulares y otros similares) en las respuestas inmunitarias, tal como la reactividad de las células T (por ejemplo, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora), se puede aplicar no solo en la selección de la molécula de unión al antígeno MAGEA1 candidata básica, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de los péptidos inmunogénicos, pMHC, células modificadas, proteínas de unión y composiciones relacionadas que se describen en la presente para aumentar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuesta inmunitaria de células T) contra células de interés, tales como células hiperproliferativas, que expresan MAGEA1, se puede monitorear en ensayos clínicos de sujetos que padecen un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En dichos ensayos clínicos, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora (por ejemplo, proliferación de células T, muerte

por células T y/o liberación de citoquinas) se puede utilizar como una "lectura" o marcador del fenotipo de una célula, tejido o sistema en particular. De manera similar, la eficacia de una terapia de células T adaptativa con células T diseñadas para que expresen una proteína de unión (por ejemplo, un TCR, un fragmento de unión a antígeno de un TCR, un CAR o una proteína de fusión que comprende un TCR y un dominio efector) según se describe en la presente para aumentar la respuesta inmunitaria a las células de interés, tales como las células hiperproliferativas, que expresan MAGEA1, se pueden monitorear en ensayos clínicos de sujetos que padecen un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En dichos ensayos clínicos, la presencia de unión y/o activación de células T y/o función efectora (por ejemplo, proliferación de células T, muerte por células T o liberación de citoquinas) se puede utilizar como una "lectura" o marcador del fenotipo de un determinada célula, tejido o sistema.

En algunas formas de realización, la presente invención provee un método para controlar la eficacia del tratamiento de una terapia (por ejemplo, compuestos, fármacos, vacunas, terapias celulares y otros similares) que incluye los pasos de: a) determinar la ausencia, presencia o el nivel de reactividad entre una muestra que se obtuvo del sujeto y una o más proteínas de unión o composición relacionada, en una primera muestra obtenida del sujeto antes de proveer al sujeto por lo menos una parte de la terapia para el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, y b) determinar la ausencia, presencia o el nivel de reactividad entre una o más proteínas de unión o composición relacionada, y una muestra que se obtuvo del sujeto presente en una segunda muestra obtenida del sujeto después de la provisión de la porción de la terapia, donde la presencia de reactividad o un nivel de reactividad más alto en la primera muestra, con relación a la segunda muestra, es una indicación de que la terapia es eficaz para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto y donde la ausencia de reactividad o un nivel de reactividad más bajo en la primera muestra, con relación a la segunda muestra, es una indicación de que la terapia no es eficaz para tratar el trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 en el sujeto.

En algunas formas de realización, la presente invención provee un método para monitorear la efectividad del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, anticuerpos, un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato a fármaco identificado por los ensayos de selección que se describen en la presente) que incluyen los pasos de: (i) obtener una muestra previa a la administración de un

sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar la expresión de MAGEA1 en la muestra previa a la administración; (iii) obtener del sujeto una o más muestras posteriores a la administración; (iv) detectar la expresión de MAGEA1 en las muestras posteriores a la administración; (v) comparar la expresión de MAGEA1 en la muestra previa a la administración con la expresión de MAGEA1 en la muestra posterior a la administración; y (vi) alterar de manera acorde la administración del agente al sujeto. También se puede utilizar el análisis de polipéptidos biomarcadores, por ejemplo, por inmunohistoquímica (IHC), para seleccionar pacientes que recibirán terapia, por ejemplo, inmunoterapia.

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

f. Eficacia clínica

La eficacia clínica se puede medir utilizando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, la respuesta a una terapia se relaciona con cualquier respuesta del trastorno asociado a la expresión de MAGEA1, por ejemplo, un tumor, a la terapia, preferiblemente a un cambio en el número de células cancerosas, masa tumoral y/o volumen tumoral, por ejemplo, después del inicio de la quimioterapia neoadyuvante o coadyuvante La respuesta del tumor se puede evaluar en una situación neoadyuvante o coadyuvante, donde se puede comparar el tamaño de un tumor después de la intervención sistémica con el tamaño y las dimensiones iniciales medidos por TC, PET, mamografía, ecografía o palpación y se puede estimar histológicamente la celularidad de un tumor y compararla con la celularidad de una biopsia tumoral tomada antes del inicio del tratamiento. La respuesta también se puede evaluar mediante la medición del calibre o el examen patológico del tumor después de una biopsia o resección quirúrgica. La respuesta se puede registrar de manera cuantitativa, por ejemplo, por el cambio porcentual en el volumen del tumor o la celularidad, o mediante el uso de un sistema de puntuación semicuantitativo, tal como la carga de cáncer residual (Symmans y col. (2007) *J. Clin. Oncol.* 25: 4414-4422) o puntuación de Miller-Payne (Ogston y col. (2003) *Breast* (Edinburgo, Escocia) 12:320-327) de manera cualitativa como “respuesta patológica completa” (pCR), “remisión clínica completa” (cCR), “remisión clínica parcial” (cPR), “enfermedad clínica estable” (cSD), “enfermedad clínica progresiva” (cPD) u otros criterios cualitativos. La evaluación de la respuesta del tumor se puede realizar poco después del inicio

de la terapia neoadyuvante o coadyuvante (por ejemplo, después de algunas horas, días, semanas o preferiblemente después de algunos meses). Un criterio de valoración típico para la evaluación de la respuesta es luego de la finalización de la quimioterapia neoadyuvante o luego de la eliminación quirúrgica de las células tumorales residuales y/o el lecho tumoral.

En algunas formas de realización, la eficacia clínica de los tratamientos terapéuticos que se describen en la presente se puede determinar midiendo el índice de beneficio clínico (CBR, las siglas en inglés de *Clinical Benefit Rate*). El índice de beneficio clínico se mide determinando la suma del porcentaje de pacientes que están en remisión completa (RC), el número de pacientes que están en remisión parcial (RP) y el número de pacientes que tienen enfermedad estable (SD) a la vez en un punto de tiempo de por lo menos 6 meses desde el final de la terapia. La abreviatura de esta fórmula es CBR = CR + PR + SD durante 6 meses. En algunas formas de realización, el CBR para un modulador de biomarcadores particular de los que se mencionan en el régimen terapéutico de la Tabla 1 es de por lo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o más.

Los criterios adicionales para evaluar la respuesta a terapias contra el cáncer están relacionados con la "supervivencia", que incluye a todo lo siguiente: supervivencia hasta la mortalidad, que también se conoce como supervivencia global (donde dicha mortalidad puede ser independiente de la causa o relacionada con el tumor); "Supervivencia libre de recurrencia" (donde el término recurrencia incluirá a la recurrencia tanto localizada como a distancia); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (donde el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas con el mismo). La duración de dicha supervivencia se puede calcular con referencia a un punto de inicio definido (por ejemplo, el momento del diagnóstico o el comienzo del tratamiento) y punto final (por ejemplo, muerte, recurrencia o metástasis). Además, los criterios de eficacia del tratamiento se pueden ampliar para que incluyan la respuesta a la quimioterapia, la probabilidad de supervivencia, la probabilidad de metástasis dentro de un período de tiempo determinado y la probabilidad de recurrencia del tumor.

Por ejemplo, para determinar los valores umbral apropiados, se puede administrar un agente de interés particular a una población de sujetos y el resultado se puede correlacionar con las mediciones de biomarcadores que se determinaron antes de la administración de cualquier terapia. La medida del resultado puede ser la respuesta de la patología a la terapia

administrada en el entorno neoadyuvante. Como alternativa, se pueden monitorear las medidas de resultado, tales como la supervivencia general y la supervivencia libre de enfermedad, durante un período de tiempo en aquellos sujetos que siguen la terapia para los cuales se conocen los valores de expresión de MAGEA1. En algunas formas de realización, se administran las mismas dosis del agente a cada sujeto. El período de tiempo durante el cual los sujetos son monitoreados puede variar. Por ejemplo, los sujetos pueden ser monitoreados durante por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 meses, o más. Los valores umbral de la medición de MAGEA1 que se correlacionan con el resultado de una terapia se pueden determinar utilizando métodos bien conocidos, tales como los que se describen en la sección de Ejemplos.

X. Terapia celular

En otro aspecto abarcado por la presente invención, se administran a sujetos los métodos incluyen la terapia celular adoptiva, mediante la cual las células modificadas que expresan las moléculas provistas dirigidas a un epítopo restringido por MHC (por ejemplo, células que expresan una proteína de unión (por ejemplo, un TCR o CAR) o que se unen a un fragmento de unión al antígeno del mismo). Dicha administración puede promover la activación de células inmunológicas (por ejemplo, la activación de células T) de una manera dirigida hacia el antígeno, de manera que se dirijan hacia las células de interés, tales como las células hiperproliferativas, que expresan MAGEA1, para destruirlas.

Por consiguiente, los métodos y usos provistos incluyen métodos y usos para una terapia celular adoptiva. En algunas formas de realización, los métodos incluyen la administración de células o de una composición que contiene las células a un sujeto, tejido o célula, tal como una que tiene, está en riesgo o se sospecha que tiene la enfermedad, condición o trastorno. En algunas formas de realización, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto que padece la enfermedad o condición particular a tratar, por ejemplo, mediante una terapia celular adoptiva, tal como mediante una terapia adoptiva con células T. En algunas formas de realización, las células o composiciones se administran al sujeto, tal como un sujeto que padece o que tiene el riesgo de padecer la enfermedad o condición. En algunas formas de realización, los métodos permiten entonces tratar, por ejemplo, aliviar, uno o más síntomas de la enfermedad o condición.

Los métodos de administración de células para una terapia celular adoptiva son conocidos y

se pueden usar con relación a los métodos y las composiciones provistas (por ejemplo, la publ. de Patente de los EEUU No. 2003/0170238, Patente de los EEUU Nº 4.690.915, Rosenberg (2011) Nat. Rev. Clin. Oncol. 8: 577-585, Themeli y col. (2013) Nat. Biotechnol. 31: 928-933, Tsukahara y col. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438:84-89, y Davila y col. (2013) *PLoS ONE* 8: e61338).

En algunas formas de realización, la terapia celular (por ejemplo, la terapia celular adoptiva, tal como la terapia adoptiva con células T) se puede llevar a cabo mediante transferencia autóloga, en donde las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir del sujeto que recibirá la terapia celular, o a partir de una muestra derivada de dicho sujeto. Por consiguiente, en algunas formas de realización, las células derivan de un sujeto (por ejemplo, un paciente) que necesita de un tratamiento y las células, se administran al mismo sujeto después de su aislamiento y procesamiento.

En algunas formas de realización, la terapia celular, tal como una terapia celular adoptiva, por ejemplo, una terapia adoptiva de células T, se puede llevar a cabo mediante transferencia alogénica, en donde las células se aíslan y/o se preparan de otra manera a partir de un sujeto distinto del sujeto que recibirá o que finalmente recibirá la terapia celular (por ejemplo, un primer sujeto). En dichas formas de realización, las células se administran luego a un sujeto diferente (por ejemplo, un segundo sujeto) de la misma especie. En algunas formas de realización, el primer y segundo sujetos son genéticamente idénticos (singénicos). En algunas formas de realización, el primer y segundo sujetos son genéticamente similares. En algunas formas de realización, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo HLA que el primer sujeto.

En algunas formas de realización, el sujeto, a quien se administrarán las células, poblaciones de células o composiciones, es un primate, tal como un ser humano. En algunas formas de realización, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser de sexo masculino o femenino y puede ser de cualquier edad adecuada, incluyendo niños, niños jóvenes, adolescentes, adultos y sujetos geriátricos. En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero no primate, tal como un roedor. En algunos ejemplos, el paciente o sujeto es un modelo animal validado para la enfermedad, terapia celular adoptiva y/o de evaluación de resultados tóxicos tal como el síndrome de liberación de citoquinas (CRS).

Las moléculas de unión, como los TCR, los fragmentos de unión al antígeno de los TCR (por

ejemplo, ScTCR) y los receptores quiméricos (por ejemplo, CAR) que contienen el TCR, y células que expresan los mismos, se pueden administrar mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyecciones intravenosas o subcutáneas, inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretinal, inyección intravítrea, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidal, inyección intracámaras, inyección subconjuntiva, inyección subconjuntiva, inyección sub-Tenon, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o administración yuxtaescleral posterior. En algunas formas de realización, se administran por vía parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se deseara, un tratamiento local, una administración intralesión. Las infusiones parenterales incluyen una administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación y administración pueden depender en parte de si la administración es breve o crónica. Los diversos esquemas de dosificación incluyen, pero en un sentido no taxativo, administraciones individuales o múltiples en varios puntos de tiempo, administración en bolo e infusión por pulsos.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de la molécula de unión o célula dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de molécula de unión, la severidad y el curso de la enfermedad, de si la molécula de unión se administra con fines preventivos o terapéuticos, de una terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la molécula de unión, y la discreción del médico de cabecera. Las composiciones y moléculas y células se administran al paciente convenientemente, en algunas formas de realización, de una vez o mediante una serie de tratamientos.

En algunas formas de realización, las células se pueden administrar a $0,1 \times 10^6$, $0,2 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $0,6 \times 10^6$, $0,7 \times 10^6$, $0,8 \times 10^6$, $0,9 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$, $5,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $5,0 \times 10^8$, o más, células por kilogramo de peso corporal del sujeto o cualquier rango entre dichos valores o cualquier valor intermedio. El número de células trasplantadas puede ajustarse en función del nivel de injerto que se desea en un período de tiempo determinado. Generalmente, se pueden trasplantar entre 1×10^5 y aproximadamente 1×10^9 células/kg de peso corporal, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 células/kg de peso corporal, o aproximadamente 1×10^7 células/kg de peso corporal, o más células, según sea necesario. En alguna forma de realización, es eficaz el trasplante de por lo menos aproximadamente $0,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$, o $5,0 \times 10^6$

células totales con relación a un ratón de tamaño medio. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células, o poblaciones individuales de subtipos celulares, se administran al sujeto en un rango de entre aproximadamente un millón y aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tal como, por ejemplo, entre 1 millón y aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1 mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), tal como entre aproximadamente 10 millones y aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células, aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), y en algunos casos entre aproximadamente 100 millones de células y aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor comprendido en estos rangos y/o por kilogramo de peso corporal. Las dosificaciones pueden variar dependiendo de características particulares de la enfermedad o trastorno y/o del paciente y/u de otros tratamientos.

El injerto de células trasplantadas se puede evaluar mediante cualquiera de diversos métodos, tales como, entre otros, el volumen del tumor, los niveles de citoquinas, el momento de la administración, el análisis por citometría de flujo de las células de interés obtenidas del sujeto en uno o más puntos de tiempo después del trasplante, y parámetros similares. Por ejemplo,

un análisis basado en el tiempo de espera 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 días o puede indicar el momento de la extracción del tumor (por ejemplo, proveer una dosis de células T-TCR infundidas cada 28 días entre sí). Cualquiera de estas medidas son variables que pueden ajustarse de acuerdo con parámetros bien conocidos para determinar el efecto de la variable en una respuesta a la inmunoterapia contra el cáncer. Además, las células trasplantadas pueden cotrasplantarse con otros agentes, tales como citoquinas, matrices extracelulares, soportes de cultivo celular y otros similares.

Las células también se pueden administrar antes, al mismo tiempo o después de otros agentes anticancerígenos.

Se pueden combinar y administrar dos o más tipos de células, por ejemplo, en una terapia basada en células y transferencia celular adoptiva de células madre, vacunas contra el cáncer y terapia basada en células, y otras similares. Por ejemplo, las inmunoterapias adoptivas basadas en células se pueden combinar con las terapias basadas en células abarcadas por la presente invención. En algunas formas de realización, los agentes basados en células se pueden usar solos o en combinación con agentes adicionales basados en células, tales como inmunoterapias como la terapia adoptiva de células T (ACT). Por ejemplo, células T modificadas para reconocer el CD19 que se usan para tratar el linfoma folicular de células B. Las células inmunológicas para ACT pueden ser células dendríticas, células T tales como células T $CD8^+$ y células T $CD4^+$, células asesinas naturales (NK), células T NK, células T citotóxicos (CTL), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células asesinas activadas por linfoquinas (LAK), células T de memoria, células T reguladoras (Treg), células T auxiliares, células asesinas inducidas por citoquinas (CIK) y cualquier combinación de las mismas. Algunas modalidades inmunoterapéuticas basadas en células adoptivas bien conocidas incluyen, sin limitación, células tumorales autólogas o alogénicas irradiadas, lisados tumorales o células tumorales apoptóticas, inmunoterapia basada en células presentadoras de antígenos, inmunoterapia basada en células dendríticas, transferencia de células T adoptivas, terapia adoptiva de células T con CAR, terapia de mejora inmunológica autóloga (AIET), vacunas contra el cáncer y/o células presentadoras de antígenos. Dichas inmunoterapias basadas en células se pueden modificar adicionalmente para expresar uno o más productos génicos para modular aún más las respuestas inmunológicas, por ejemplo, la expresión de citoquinas como GM-CSF y/o para expresar antígenos de antígenos asociados a tumores

(TAA), como Mage-1, gp-100 y otros similares. La relación de un agente abarcado por la presente invención, tal como las células cancerosas, a otro agente abarcado por la presente invención u otra composición puede ser 1:1 entre sí (por ejemplo, cantidades iguales de 2 agentes, 3 agentes, 4 agentes, etc.), pero se puede modular en cualquier cantidad que se desee (por ejemplo, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1, 6,5:1, 7:1, 7,5:1, 8:1, 8,5:1, 9:1, 9,5:1, 10:1 o mayor).

En algunas formas de realización, por ejemplo, donde el sujeto es un humano, la dosis incluye menos de aproximadamente $1x10^8$ células que expresan proteínas de unión totales (por ejemplo, TCR o CAR), células T o células mononucleares de sangre periférica (PBMC), por ejemplo, en el rango de entre aproximadamente $1x10^6$ y $1x10^8$ de dichas células, tal como $2x10^6$, $5x10^6$, $1x10^7$, $5x10^7$ o $1x10^8$ o todas dichas células, o en un rango entre cualesquiera dos de los valores precedentes.

En algunas formas de realización, las células o composiciones relacionadas que se describen en la presente, tales como ácidos nucleicos, células huésped, formulaciones farmacéuticas y otras similares se pueden administrar como parte de un tratamiento combinado, tal como simultáneamente o en secuencia, en cualquier orden, con otra intervención terapéutica, tal como otro anticuerpo o célula modificada o receptor o agente, tal como un agente citotóxico o terapéutico.

En algunas formas de realización, las células o la composición relacionada pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con otra intervención terapéutica, ya sea de manera simultánea o en secuencia en cualquier orden. En algunos contextos, las células o la composición relacionada se coadministran con otra terapia lo suficientemente cercana en el tiempo como para que las poblaciones de células mejoren el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunas formas de realización, las células o la composición relacionada se administran antes de los uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunas formas de realización, las células o la composición relacionada se administran después de los uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En algunas formas de realización, la actividad biológica de las células o la composición relacionada se mide mediante cualquiera de diversos métodos conocidos una vez que las células o la composición relacionada se administran a un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T natural o modificada u otra célula inmunológica al antígeno, *in vivo*, por ejemplo, mediante imágenes, o *in vitro*/ex vivo, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En algunas formas de realización, la capacidad de las células de destruir células diana (citotoxicidad) se puede medir usando cualquier ensayo o método apropiado conocido en el arte (por ejemplo, Kochenderfer y col. (2009) *J. Immunother.* 32: 689-702 y Herman y col. (2004) *J. Immunol.* Meth. 285: 25-40). En algunas formas de realización, también se puede medir la actividad biológica de las células ensayando la expresión y/o secreción de ciertas citoquinas, tales como CD107a, IFNγ, IL-2 y TNF alfa. En algunas formas de realización, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, por ejemplo, la reducción de la carga viral.

En algunas formas de realización, las células se modifican de numerosas maneras, de manera tal que aumenta su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, la proteína de unión (por ejemplo, TCR, CAR o un fragmento de unión al antígeno modificado) expresada por la población puede conjugarse directa o indirectamente a través de un conector a una unidad de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos con unidades de direccionamiento es bien conocida en el arte (por ejemplo, Wadwa y col. (1995) *J. Drug Targeting* 3: 111 y Patente de los EEUU Nº 5.087.616).

Las células inmunológicas, como los linfocitos citotóxicos, se pueden obtener de cualquier fuente adecuada, como sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos. Las células inmunológicas se pueden usar como preparaciones crudas o como preparaciones parcialmente purificadas o sustancialmente purificadas, que se pueden obtener mediante técnicas estándar que incluyen, pero en un sentido no taxativo, métodos que involucran técnicas inmunomagnéticas o de citometría de flujo usando anticuerpos.

En determinados aspectos, los péptidos inmunogénicos de MAGEA1 que se describen en la presente, o un ácido nucleico que codifica dichos péptidos inmunogénicos de MAGEA1, se pueden usar en composiciones y métodos para proporcionar células presentadoras de antígeno, sensibilizados con MAGEA1, y/o linfocitos específicos de MAGEA1 generados con estas células presentadoras de antígeno. En algunas formas de realización, dichas células presentadoras de antígeno y/o linfocitos se usan en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno asociado con la expresión de MAGEA1.

En algunos aspectos, en la presente se proveen métodos para producir células presentadoras

de antígeno cebadas con MAGEA1 poniendo en contacto células presentadoras de antígeno con un péptido inmunogénico MAGEA1 que se describe en la presente, o ácidos nucleicos que codifican por lo menos un péptido inmunogénico MAGEA1, solo o en combinación con un coadyuvante, *in vitro* en condiciones suficientes para que las células presentadoras de antígeno presenten por lo menos un polipéptido inmunogénico MAGEA1.

En algunas formas de realización, el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o un ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1 solo o en combinación con un adyuvante, se puede poner en contacto con una composición homogénea, sustancialmente homogénea o heterogénea que comprende células presentadoras de antígeno. Por ejemplo, la composición puede incluir, pero en un sentido no taxativo, sangre completa, sangre fresca o fracciones de las mismas tal como, pero en un sentido no taxativo, células mononucleares de sangre periférica, fracciones de la capa leucocitaria de sangre completa, glóbulos rojos empaquetados, sangre irradiada, células dendríticas, monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células asesinas naturales y células T asesinas naturales. Si, opcionalmente, se usan precursores de células presentadoras de antígeno, dichos precursores se pueden cultivar bajo condiciones de cultivo adecuados suficientes para diferenciar los precursores en células presentadoras de antígeno. En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno (o precursoras de las mismas) se seleccionan entre monocitos, macrófagos, células del linaje mieloide, células B, células dendríticas o células de Langerhans.

La cantidad del polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o del ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o en combinación con un adyuvante, que se pondrá en contacto con las células presentadoras de antígeno puede ser determinada por un experto en el arte mediante experimentación de rutina. En general, las células presentadoras de antígeno se ponen en contacto con el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o con el ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o en combinación con un adyuvante, por un período de tiempo suficiente para que las células presenten las formas procesadas de los antígenos para la modulación de células T. En una forma de realización, las células presentadoras de antígeno se incuban en la presencia del polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o del ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o en combinación con un adyuvante, por menos de aproximadamente una

semana, a efectos ilustrativos, entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 48 horas, entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 36 horas, entre aproximadamente 3 minutos y aproximadamente 24 horas, entre aproximadamente 4 minutos y aproximadamente 12 horas, entre aproximadamente 6 minutos y aproximadamente 8 horas, entre aproximadamente 8 minutos y aproximadamente 6 horas, entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 5 horas, entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2 horas y entre aproximadamente 40 minutos y aproximadamente 1 hora. El tiempo y la cantidad del polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o del ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o en combinación con un adyuvante, que son necesarios para que las células presentadoras de antígeno procesen y presenten los antígenos se pueden determinar, por ejemplo, usando métodos de seguimiento de pulsos, en donde el contacto es seguido por un período de lavado y exposición a un sistema de lecturas, por ejemplo, de células T reactivas con el antígeno.

En determinadas formas de realización, se puede usar cualquier método apropiado para administrar los antígenos a la vía de procesamiento endógeno vía de las células presentadoras de antígeno. Dichos métodos incluyen, pero en un sentido no taxativo, métodos que involucran liposomas sensibles a pH, acoplamiento de antígenos a adyuvantes, administración por células apoptóticas, pulsos de las células sobre células dendríticas, administración de partículas tipo virus (VLP) quiméricas recombinantes que comprenden antígenos para la vía de procesamiento del MHC de clase I de una línea de células dendríticas.

En una forma de realización, el polipéptido inmunogénico de MAGEA1 solubilizado se incuba con las células presentadoras de antígeno. En algunas formas de realización, el polipéptido inmunogénico de MAGEA1 se puede acoplar con una citolisina para mejorar la transferencia de los antígenos hacia el citosol de una célula presentadora de antígeno para la administración a la vía del MHC de clase I. Los ejemplos de citolisinas incluyen compuestos de saponinas tales como los complejos inmunoestimulantes (ISCOM5) que contienen saponina, toxinas formadoras de poros (por ejemplo, una alfa-toxina) y citolisinas naturales de bacterias Gram-positivas tales como listeriolisina O (LLO), estreptolisina O (SLO) y perfringolisina O (PFO).

En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas y macrófagos, se pueden aislar de acuerdo con métodos conocidos en el arte y transfectar con polinucleótidos mediante métodos conocidos en el arte para introducir un ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico de MAGEA1 en las células presentadoras de antígeno. Los reactivos y métodos de transfección son conocidos en el arte y se encuentran disponibles comercialmente. Por ejemplo, se puede proveer el ARN que codifica un polipéptido inmunogénico de MAGEA1 en un medio adecuado y combinarlo con un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico) antes del contacto con las células presentadoras de antígeno. Los ejemplos no taxativos de dichos lípidos incluyen LIPOFECTIN™ y LIPOFECTAMINA™. El complejo de polinucleótido-lípido resultante se puede poner en contacto entonces con las células presentadoras de antígeno. Como alternativa, el polinucleótido se puede introducir en las células presentadoras de antígeno usando técnicas tales como electroporación o transfección con fosfato de calcio. Las células presentadoras de antígeno cargadas con el polinucleótido se pueden usar luego para estimular la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) *in vitro*, *ex vivo* o *In vivo*. En una forma de realización, el linfocito T expandido *ex vivo* se administra a un sujeto en un método de inmunoterapia adoptiva.

En determinados aspectos, en la presente se provee una composición que comprende células presentadoras de antígeno que han estado en contacto *in vitro* con un polipéptido inmunogénico de MAGEA1, o con un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico de MAGEA1, solo o en combinación con un adyuvante bajo una condición suficiente para que un epítopo inmunogénico de MAGEA1 sea presentado por las células presentadoras de antígeno.

En algunos aspectos, en la presente se provee un método para preparar linfocitos específicos de una proteína MAGEA1. El método comprende poner linfocitos en contacto con las células presentadoras de antígeno descritas precedentemente bajo condiciones suficientes como para producir un linfocito específico de una proteína MAGEA1 capaz de generar una respuesta inmunológica contra una célula que está infectada con el virus MAGEA1. Por consiguiente, las células presentadoras de antígeno también se pueden usar para proveer linfocitos, inclusive linfocitos T y linfocitos B, a fin de generar una respuesta inmunológica contra una célula que está infectada con el virus MAGEA1.

En algunas formas de realización, se pone una preparación de linfocitos T en contacto con las células presentadoras de antígeno descritas precedentemente por un período de tiempo, (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 24 horas) para sensibilizar los linfocitos T a un epítopo inmunogénico de MAGEA1 presentado por las células presentadoras de antígeno.

En algunas formas de realización, se puede cocultivar una población de células presentadoras de antígeno con una población heterogénea de células T de sangre periférica junto con un polipéptido inmunogénico MAGEA1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico MAGEA1, solo o en combinación con un coadyuvante. Las células se pueden cocultivar durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que los epítopos MAGEA1 incluidos en los polipéptidos MAGEA1 sean presentados por las células presentadoras de antígenos y las células presentadoras de antígenos ceben una población de linfocitos T para que respondan a las células infectadas por el virus MAGEA1. En algunas formas de realización, en la presente se proveen células T y linfocitos B que están cebados para responder a las células que están infectadas por el virus MAGEA1.

Los linfocitos T se pueden obtener de cualquier fuente adecuada, tal como sangre periférica, bazo y nódulos linfáticos. Los linfocitos T se pueden usar como preparaciones crudas o como preparaciones parcialmente purificadas o sustancialmente purificadas, que se pueden obtener mediante técnicas estándar que incluyen, pero en un sentido no taxativo, métodos que involucran técnicas inmunomagnéticas o de citometría de flujo usando anticuerpos.

En determinados aspectos, en la presente se provee una composición (por ejemplo, a composición farmacéutica) que comprende las células presentadoras de antígeno o los linfocitos descritos precedentemente, y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición comprende además un adyuvante como se describió precedentemente.

En algunos aspectos y según se describió anteriormente, en la presente se provee un método para provocar una respuesta inmunitaria en la célula infectada por el virus MAGEA1, donde el método comprende administrar al sujeto las células presentadoras de antígenos o los linfocitos descritos anteriormente en cantidades efectivas suficientes para provocar la respuesta inmune. En algunas formas de realización, en la presente se provee un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1, donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de las células

presentadoras de antígenos o los linfocitos descritos anteriormente. En una forma de realización, las células presentadoras de antígeno o los linfocitos se administran por vía sistémica, preferiblemente mediante inyección. Como alternativa, se las puede administrar localmente en lugar de sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección directa en el tejido, preferiblemente en una formulación depot o de liberación sostenida.

En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno cebadas con antígeno que se describen en la presente y las células T específicas del antígeno generadas con estas células presentadoras de antígeno se pueden utilizar como compuestos activos en composiciones inmunomoduladoras para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1. En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno cebadas con MAGEA1 que se describen en la presente se pueden utilizar para generar células T $CD8^+$, células T $CD4^+$ y/o linfocitos B para transferencia adoptiva al sujeto. Así, por ejemplo, los linfocitos específicos de MAGEA1 se pueden transferir de manera adoptiva con fines terapéuticos a sujetos que padece un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1.

En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígenos y/o los linfocitos que se describen en la presente se pueden administrar a un sujeto, solos o en combinación, para provocar una respuesta inmunitaria, en particular para provocar una respuesta inmunitaria a las células que expresan MAGEA1. En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno y/o los linfocitos pueden derivar del sujeto *(*es decir, células autólogas) o de un sujeto diferente cuyo MHC coincide o no coincide con el sujeto (por ejemplo*,* alogénico).

Las administraciones simples o múltiples de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos se pueden llevar a cabo con cantidades de células y tratamientos seleccionados por el personal de salud *(*por ejemplo*,* el médico). En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno y/o los linfocitos se administran en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados pueden comprender el medio de crecimiento en el cual se cultivaron las células, o cualquier medio de amortiguación adecuado tal como solución amortiguadora salina con fosfato. Las células se pueden administrar solas o como una terapia adjunta junto con otros agentes terapéuticos.

En otro aspecto que abarca la presente invención, se provee un método para provocar una

respuesta inmunitaria a una célula que expresa MAGEA1, donde el método comprende administrar las células objeto que se describen en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificados, CAR, o un fragmento de unión a antígeno del mismo) en cantidades efectivas suficientes para provocar la respuesta inmunitaria. En algunas formas de realización, en la presente se provee un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1), donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de las células descritas en el presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificados, CAR, o un fragmento de unión a antígeno del mismo). En una forma de realización, las células se administran sistémicamente, por ejemplo, por inyección. Como alternativa, en vez de hacerlo sistémicamente se pueden administrar localmente, por ejemplo, a través de una inyección directamente en el tejido, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

En algunas formas de realización, las células que se describen en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o un fragmento de unión al antígeno de los mismos) se pueden usar como compuestos activos en composiciones inmunomoduladoras para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno caracterizado por la expresión de MAGEA1 (por ejemplo, un trastorno no maligno, un trastorno hiperproliferativo, o una recaída de un trastorno hiperproliferativo caracterizado por la expresión de MAGEA1). En algunas formas de realización, las células presentadoras de antígeno cebadas con MAGEA1 se pueden usar para generar linfocitos (por ejemplo, células T $CD8^+$, células T $CD4^+$ y/o linfocitos B), para uso adicional en la transferencia adoptiva al sujeto con las células que se describen en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o un fragmento de unión al antígeno de los mismos).

En algunas formas de realización, las células que se describen en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o un fragmento de unión al antígeno de los mismos), ya sea solas o en combinación con los linfocitos, se pueden administrar a un sujeto para provocar una respuesta inmunológica, particularmente para provocar una respuesta inmunológica a las células están expresando MAGEA1.

Según se describió anteriormente, las administraciones únicas o múltiples de las células que

se describen en la presente que expresan una proteína de unión (por ejemplo, TCR modificado, CAR o un fragmento de unión al antígeno de los mismos), ya sea solas o en combinación con los linfocitos, se pueden llevar a cabo con cantidades de células y tratamientos seleccionados por el proveedor de atención (por ejemplo, un médico). De manera similar, las células, solas o en combinación con linfocitos, se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados pueden comprender el medio de crecimiento en el cual se cultivaron las células, o cualquier medio de amortiguación adecuado tal como solución amortiguadora salina con fosfato. Las células se pueden administrar solas o como una terapia adjunta junto con otros agentes terapéuticos.

XI. Kits y dispositivos

La presente invención también abarca kits y dispositivos. Por ejemplo, el kit o dispositivo puede comprender proteínas de unión, ácidos nucleicos o vectores que comprenden secuencias que codifican proteínas de unión, células huésped que comprenden ácidos nucleicos o vectores y/o que expresan las proteínas de unión según se describen en la presente, complejos de péptido-MHC estables, coadyuvantes, reactivos de detección y combinaciones de los mismos, envasados en un recipiente apropiado y pueden comprender además instrucciones para usar dichos reactivos. El kit también puede contener otros componentes, tales como herramientas de administración envasados en un recipiente separado. El kit puede ser promocionado, distribuido, o vendido como una unidad para realizar los métodos abarcados por la presente invención.

La divulgación se ilustra además con los siguientes ejemplos que no se deben considerar como limitaciones de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos para los Ejemplos 2-7

a. Colección de células mononucleares de sangre periférica humana

Se recolectaron leukopaks de donantes sanos positivos para HLA-A*01:01 en HemaCare (Los Ángeles, CA), StemExpress (Placerville, CA) y Discovery Life Sciences (Huntsville, AL) usando sus protocolos aprobados por IRB. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de leukopaks frescos de HemaCare y Discovery Life Sciences mediante centrifugación en gradiente de densidad usando medio de separación de linfocitos (Corning, Corning, NY). Las PBMC contenidas en la capa de linfocito se recolectaron después

de centrifugación, se lavaron 3 veces con DPBS (Cytiva, Marlborough, MA) y se contaron. Las PBMC se aislaron a partir de leukopaks de StemExpress ya sea mediante centrifugación en gradiente de densidad igual que antes, o usando el kit de aislamiento de PBMC de leukopak comercial (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) con el instrumento MultiMACS Cell24 Separator Plus, versión 3 (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del proveedor. Las PBMC aisladas se congelaron en CryoStor® CS10 (StemCell Technologies, Cambridge, MA) y se guardaron en nitrógeno líquido.

b. Cribados ReceptorScan

i. Cultivo de DC

El aislamiento de monocitos se realizó el día -4 usando PBMC aisladas de donantes sanos HLA-A*01:01-positivos con el kit de selección de CD14 positivo humano II EasySep™ (StemCell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La pureza y la expresión de la molécula coestimulante se evaluaron usando anticuerpos marcados con fluorescencia específicos de CD14 (M5E2, BioLegend, Dedham, MA), HLA-A2 (BB7.2, BioLegend), CD80 (2D10, BioLegend), CD83 (HB15e, BioLegend) y CD86 (IT2.2, BioLegend); la expresión de CD14 era >90%. Los monocitos $CD14^+$ se resuspendieron en medio AIM-V (Thermo Fisher Scientific) suplementado con GM-CSF recombinante humano e IL-4 (R&D Systems, Mineápolis, MN) a concentraciones finales de 800 IU/ml y 1000 IU/ml, respectivamente. El día -2, se agregó TNF-α recombinante humano (10 ng/ml), IL-6 (1000 IU/ml) e IL-1β (2 ng/ml) (R&D Systems), así como PGE2 (1 µg/ml, StemCell Technologies), al cultivo de monocitos.

ii. Aislamiento de células T naïve para CD8

El día -1, se aislaron células T CD8 naïve autólogas de PBMC de donantes sanos que expresan HLA-A*01:01 usando el kit de aislamiento de células T CD8+ naïve humanas II EasySep™ (StemCell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La pureza se evaluó usando anticuerpos marcados con fluorescencia específicos de HLA-A/B/C (W6/32, BioLgened), CD8α (HIT8a, BioLegend), CD45RO (UCHL1, BioLegend), CD45RA (HI100, BioLegend), CD56 (5,1H11, BioLegend), CD57 (HCD57, BioLegend) y CCR7 (G043H7, BioLegend); la pureza de las células T $CD8\alpha^+$ naive era >90%. Las células se dejaron en reposo durante la noche a 37 ºC, 5% de CO_2 en medio de células T (medio X-VIVO™ 15 libre de suero [Lonza, Rockland, MD] que contiene 10% de suero humano [Sigma

Aldrich, St. Louis, MO], 1% de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific], 1% de GlutaMAX™ [Thermo Fisher]), suplementado con IL-7 humana recombinante 10 ng/ml (R&D Systems).

iii. Cocultivo

El día 0, se volvió a evaluar la pureza de células T CD8 usando el panel de anticuerpos idéntico al del día 3, y la maduración de DC se confirmó por un aumento de la expresión de HLA-A/B/C, CD80, CD83 y CD86 y una disminución de la expresión de CD14. Las DC se pulsaron con el péptido MAGE-A1$_{161-169}$ 1 µM (EADPTGHSY, GenScript [Piscataway, NJ]) durante 3 horas a 37 ºC, 5% de CO_2. Las DC pulsadas se cocultivaron con las células T CD8 naïve restadas en medio de células T suplementado con IL-12 (10 ng/ml) e IL-21 (60 ng/ml) humanas recombinantes (R&D Systems). Los cocultivos se suplementaron con IL-7 e IL-15 recombinantes humanas (R&D Systems) entre los días 3 y 10.La tinción de dextrámeros para las células específicas de MAGE-A1 se efectuó el día 11 usando un péptido A*01:01 MAGE-A1$_{161-169}$ (dextrámero EADPTGHSY) (Immudex, Copenhague, Dinamarca), CD8α y TCRα/β (IP26, BioLegend) y DAPI (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

iv. Separación de células específicas del antígeno

El día 12, se recolectaron las células y se tiñeron con el dextrámero del péptido A*01:01 MAGE-A1$_{161-169}$ (EADPTGHSY), así como con anticuerpos específicos para CD8α y TCRα/β, y con DAPI como el día 11, y se separaron las células positivas para MAGE-A1$_{161-169}$ (CD8α$^+$, DAPI$^-$, TCRα/β$^+$, MAGE-A1$^+$) usando un separador de células Sony SH800S (Sony Biotechnology, San José, CA), BigFoot Cell Sorter (ThermoFisher Scientific) o un separador de células MoFlo Astrios (Beckman Coulter, Brea, CA). Las células separadas fueron sometidas a secuenciación de TCRα/β de una sola célula usando la plataforma 10x Genomics (Pleasanton, CA).

v. Citometría de flujo

Las células se adquirieron usando un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter, Indianápolis, IN) y se analizaron usando el software FlowJo (versión 10, TreeStar, Ashland, O).

c. Secuenciación de TCRα/β de una sola célula usando la plataforma 10x Genomics

Se prepararon bibliotecas de TCR-seq (scTCR-seq) de una sola célula de acuerdo con el

protocolo del kit de reactivos 10x Genomics Single Cell V(D)J (v1) (10x Genomics). Se capturó un número diana de 10.000 células por muestra en goats (GEMs) dentro del instrumento 10x Genomics Chromium antes de realizar la transcripción inversa. Después de la transcripción inversa, se rompieron las GEM, y se purificó el ADNc marcado con código de barras a partir de las muestras usando esferas magnéticas Silane. El ADNc se amplificó de la siguiente manera: 98 °C durante 45 segundos; 13 ciclos de 98 °C durante 20 segundos, 67 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 1 minuto). Después de la purificación de las muestras con 0,6X esferas SPRIselect (Beckman Coulter), se usaron 2 µl de cada biblioteca para el enriquecimiento en secuencias de TCR. El enriquecimiento en secuencias TCR consistía en 2 rondas de PCR para amplificar los transcriptos de las cadenas TCRα y TCRβ. Subsiguientemente, se fragmentaron las bibliotecas enriquecidas en TCR, se repararon los extremos y se amplificaron con cebadores de indexación. Las bibliotecas completamente ensambladas se secuenciaron con un instrumento Illumina NextSeq (Illumina, San Diego, CA) usando un kit High Output v2.5 (150 ciclos) con longitudes de lectura de: 26 bp (lectura 1), 8 bp (índice i7) y 98 bp (lectura 2). Las lecturas de scTCRseq secuenciadas se procesaron usando la línea Cellranger 3.1.0. Las lecturas se alinearon con el genoma de referencia GRCh38, y se usó el módulo Cellranger vdj para anotar las secuencias de TCR consenso.

d. Empaquetamiento lentiviral y cuantificación del título lentiviral

Se colocaron células Lenti-X™ (Takara Bio EUA, Mountain View, CA) en placas a un confluencia del 75 % y se transfectaron con el uso de un reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Brevemente, las construcciones lentivirales se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) e incubados con un reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante y se agregó un medio SFM OptiPRO™ a 24 horas (24 h) luego de la transfección. Los sobrenadantes se recolectaron 48 h luego de la transfección. Los sobrenadantes virales para producir un virus TCR se concentraron con el uso de concentradores centrífugos Vivaspin® 20 o casetes Vivaflow® 50 (Sartorius, Bohemia, NY).

La titulación del virus para los sobrenadantes se determinó mediante RT-qPCR con el uso de un kit de RT-qPCR de una etapa Luna® Universal (New England BioLabs) en un QuantStudio 7 Pro (ThermoFisher Scientific). Brevemente, el virus se diluyó en PBS, se lisó y se utilizaron

2 µl del virus lisado en RT-qPCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó la curva estándar con el uso de diluciones en serie del virus con una titulación conocida. La titulación se expresó como TU/ml.

***e. Evaluación funcional de TCR específicos de* MAGEA1$_{161-169}$**

i. Modificación de T células para expresar los TCR específicos de MAGEA1$_{161-169}$

Se aislaron células pan T usando el kit StraightFrom® Leukopak® CD3 Microbead (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las células T aisladas se activaron con el cóctel de activación de células T CD3/CD28/CD2 ImmunoCult (StemCell Technologies) y se cultivaron durante la noche en medio de células T completo (RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, IL-2 humana recombinante [50 U/ml, PeproTech, Cranbury, NJ], IL-15 humana recombinante [5 ng/ml, R&D Systems] e IL-7 humana recombinante [5 ng/ml, (R&D Systems]). A las 24 horas de postactivación, las células T se transdujeron con sobrenadantes virales TCR MAGEA1$_{161-169}$. A las 24 horas de postransducción, las células T fueron transferidas ya sea a placas G-REX® (Wilson Wolf) o placas de 96 pocillos VECELL® (Cosmo Bio Co.) y se expandieron por un total de 7-11 días después de la activación. Los cultivos de células T se suplementaron con IL-2 [50 U/ml, PeproTech, Cranbury, NJ], IL-15 humana recombinante [5 ng/ml, R&D Systems] e IL-7 humana recombinante [5 ng/ml, (R&D Systems] nuevas cada 2-3 días y/o se partieron para mantener densidades celulares óptimas.

ii. Citometría de flujo de células pan T transducidas con MAGEA1$_{161-169}$ *TCR modificados*

Se tiñeron células T pan modificadas con el dextrámero HLA-A*:01:01 MAGEA1$_{161-169}$ (EADPTGHSY) (Immudex), TCR α/β PE-Cy7 (IP26, BioLegend), CD8 PerCP-Cy5,5 (HIT8a, BioLegend), CD4 APC-Cy7 (OKT4, Biolegend) y CD34 Alexa Fluor 488 (QBEND/10, R&D Systems) y DAPI según las instrucciones del proveedor. Las células se corrieron luego en el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter) y se analizaron usando el software FlowJo (versión 10, TreeStar).

iii. Líneas celulares

La línea celular de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) NCI-H1703 (ATCC CRL-5889) y las líneas celulares de melanoma maligno A101D (ATCC CRL-7898) / A-375 (ATCC CRL-1619 y la línea celular de riñón HEK293T (ATCC CRL-3216) se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Se cultivaron células T2 en IMDM que contiene

20% de FBS inactivado por calor, 1% de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific]. Las células NCI-H1703 se cultivaron en RPMI 1640 que contiene 10% de FBS inactivado por calor y 1% de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific]. Las líneas A101D, A-375, y HEK293T se cultivaron en DMEM que contiene 10% de FBS inactivado por calor, 1% de penicilina-estreptomicina [Thermo Fisher Scientific].

iv. Generación de líneas celulares estables que expresan Incucyte® Nuclight Red

Se transdujeron células NCI-H1703, A-375 y A1-HEK293T con el reactivo Incucyte® NucLight Red Lentivirus (promotor EF-1α, selección con puromicina) (Sartorius) en medio libre de suero a un valor MOI de 5. A las 24 horas de postransducción, las células se lavaron y se resuspendieron en sus respectivos medios de línea celular y se cultivaron a 37 ºC, 5% de CO_2. A los 3 días de postransducción, se agregó puromicina (Gibco, Waltham, MA) a los cultivos a una concentración predeterminada (en un rango entre 0,5 ug/ml y 1 ug/ml) para seleccionar las células transducidas. Los cultivos se expandieron bajo selección con puromicina hasta que eran por lo menos un 98% positivas para Nuclight Red determinador mediante análisis por citometría de flujo.

v. Ensayo de citotoxicidad in vitro

Se condujeron ensayos de citotoxicidad *in vitro* para las líneas celulares adherentes en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos sin recubrir con poli-L-ornitina. Aquí, las células adherentes se plaquearon y se dejó que se fijaran el día antes de agregar las células T. Cuando está indicado, las células T se cocultivaron con células NCI-H1703, A101D, A-375 o A2-HEK293T que expresan Nuclight Red a relaciones de E:T que variaban en un rango entre 5:1 y 1:5, como se indicara. Los datos se adquirieron con un instrumento Incucyte S3 (Sartorius), y se cuantificó el crecimiento de las células diana sobre Incucyte S3 como una lectura de la citotoxicidad de las células T.

vi. Ensayo de producción de citoquinas

Se cocultivaron células T con células NCI-H1703, A101D, A-375, y A1-HEK293T que expresan Nuclight Red a una relación de E:T de 1:1. Las células T se cocultivaron con A1-HEK293T pulsadas con péptidos MAGEA1, MAGEA10 o MAGEA11 en un intervalo de concentraciones de péptidos (0-20.000 ng/ml de péptidos). Los sobrenadantes se cosecharon 24 horas después y se congelaron a -80 ºC. Los sobrenadantes se descongelaron y se cargaron sobre un cartucho Analyte (ProteinSimple, San José, CA) para evaluar los niveles de

IFN-γ usando el instrumento Ella™ (ProteinSimple).

f. Evaluación in vivo de TSC-204-A0101 (células T-TCR que expresan TCR MAGE-A1-458)

Se evaluaron células T-TCR TSC-204-A0101 (células T-TCR que expresan TCR MAGE-A1-458) *in vivo* para la eficacia antitumoral contra el modelo tumoral NCI H1703 en ratones hembra NCG.

i. Modificación de células T

Se aislaron células T pan con el kit de microperlas CD3 StraightFrom® Leukopak® (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células T aislados se activaron con un cóctel activador de células T CD3/CD28/CD2 ImmunoCult (StemCell Technologies) y se cultivaron durante la noche en medio completo para células T (RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) activado con calor al 10 %, penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 100 µg/mL, IL-2 humana recombinante [50U/mL, PeproTech, Cranbury, NJ], IL-15 humana recombinante [5 ng/mL, R&D Systems], y IL-7 humana recombinante [5ng/mL, (R&D Systems]). 24 horas luego de la activación, las células T se transdujeron con sobrenadantes virales de TCR MAGEA1$_{161\text{-}169}$. 24 horas luego de la transducción, las células T se transfirieron a placas G-REX® (Wilson Wolf) o placas de 96 pocillos VECELL® (Cosmo Bio Co.) y se expandieron durante un total de 7-11 días luego de la activación. Los cultivos de células T se complementaron con IL-2 fresca [50U/mL, PeproTech, Cranbury, NJ], IL-15 humana recombinante [5 ng/mL, R&D Systems] y IL-7 humana recombinante [5ng/mL, (R&D Systems] cada 2-3 días y/o se dividieron para mantener densidades celulares óptimas. Las células T se congelaron y se criopreservaron.

ii. Modelo de células cancerosas

Se adquirió la línea celular NCI-H1703, derivadas de cáncer de pulmón no microcítico, de ATCC (n.º de catálogo CRL-588) y se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El medio de cultivo celular utilizado para cultivar esta línea celular fue RPMI-1640 (ATCC) complementado con FBS al 10 % (Gibco). Las células tumorales se mantuvieron en un crecimiento de fase logarítmico en matraces de cultivo de tejido en una incubadora humidificada a 37 ºC en una atmósfera de CO2 al 5 % y aire al 95 %.

iii. Crecimiento, selección de la inoculación tumoral y asignación al estudio

Se inocularon de forma subcutánea ratones hembra NOD-*Prkdc*^{em26Cd52}*Il2r*^{gem26Cd22}/NjuCrl

(NCG) con 100 µL de una mezcla de Matrigel al 50 % (Corning)/medio al 50 % con $2x10^6$ células NCI-H1703 vivas para establecer los tumores. Los tumores se midieron mediante calibrador bisemanalmente desde el Día 7 al Día 38 luego del implante. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen tumoral medio de ~100 mm^3 (Día 8), los ratones se aleatorizaron para crear dos grupos de tratamiento (n=7 ratones/grupo) para recibir las inyecciones de células T-TCR TSC-204-A0101, o de las células T de control no transducidos (NTD) compatibles con el donante.

iv. Formulación de células T y administración de materiales de prueba

En el Día 9 y 16, las células T se descongelaron con el uso de un baño de agua a 37 ºC y se transfirieron a medio de descongelamiento que consiste en medio X-VIVO 15 (Lonza Cat# 04-418Q), y suero humano inactivado con calor al 5 % (Sigma Cat n.º H3667). Luego, las células T se lavaron y resuspendieron en un volumen adecuado de PBS estéril para obtener la suspensión de dosificación a concentraciones de $2x10^7$ linfocitos $CD34^+$ viables por 0,1 mL. La dosis de células T de control NTD inyectados se ajustaron para coincidir con la cantidad total de células vivas necesarias para TSC-204-A0101. Los ratones se inyectaron de forma intravenosa con 100 µL de suspensión celular.

g. Alorreactividad y cribados de seguridad

i. Modificación de células T

Se aislaron células T CD3+ primarias a partir de Leukopaks usando el kit StraightFrom® Leukopak® CD3 Microbead (Miltenyi Biotec) (Alorreactividad), o se aislaron células T CD8+ primarias a partir de Leukopaks usando el kit StraightFrom® Leukopak® CD8 Microbead (Miltenyi Biotec) (Safety) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Se congelaron células aisladas en CryoStor® CS10 (Stem Cell Technologies) y se guardaron en nitrógeno líquido hasta el momento del uso. El día -1, las células T $CD3^+$ o $CD8^+$ se descongelaron, se lavaron con medio para células T completo (RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS), 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, IL-2 recombinante humana [50 U/ml, PeproTech, Cranbury, NJ], IL-15 recombinante humana [5 ng/ml, R&D Systems] y la IL-7 recombinante humana [5 ng/ml, (R&D Systems]). El día 0, las células T se lavaron y resuspendieron en medio de células T fresco y se activaron usando el activador de células T CD3/CD28/CD2 humanas ImmunoCultTM (5 µl/1 x 106 células T, Stem Cell Technologies). El día 1, las células se lavaron y se resuspendieron en medio de células T

completo fresco y se plaquearon a razón de 1 x 10^6 células por pocillo. Se transdujeron pocillos por triplicado con partículas lentivirales para expresar MAGE-A1-458. El día 2, las células se lavaron, los triplicados se resuspendieron y se combinaron en medio de células T completo fresco, y se expandieron hasta el día 5 en 1 pocillo de una placa de 6 pocillos G-REX® (Wilson Wolf).

ii. Generación de matrices que expresan MHC basadas en 96 pocillos para cribados de alorreactividad

Se noquearon los genes HLA-A/B/C endógenos en células HEK293T mediante ingeniería CRISPR-Cas. Los ARN guía (ARNg) se diseñaron contra secuencias conservadas en los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C utilizando la herramienta multicrispr.net (Prykhozhij y col., Plos One, 2015). Se seleccionaron las siguientes guías: CRISPR-ALL-1: CGGCTACTACAACCAGAGCG, CRISPR-ALL-2: AGATCACACTGACCTGGCAG, CRISPR-ALL-3: AGGTCAGTGTGATCTCCGCA. Se clonaron los ARNg en el vector LentiCRISPR V2 usando sitios BsmBI Las células HEK293T se transfectaron con construcciones guía de plásmidos usando Mirus TransIT (Mirus Bio, Madison, WI). Después de 7 días, las células con el MHC noqueado (MHC-KO) se clasificaron usando un anticuerpo pan-MHC (BioLegend). Se expandieron clones unicelulares y se verificó la ausencia de MHC mediante citometría de flujo. Se usaron células con noqueo de B2M (B2M-KO) como control positivo para la ausencia total de expresión de MHC en la superficie. Se noqueó B2M en células HEK293T mediante electroporación de CRISPR RNP dirigidos a B2M utilizando el ARN guía: GGCCACGGAGCGAGACATCT.

Se transdujeron células HEK293T nulas para MHC con el virus IncuCyte® NucLight™ Red (Essen BioScience). Las células transducidas se clasificaron en base a la expresión de NucLight™ Red utilizando un clasificador Sony SH800. Para generar un arreglo que expresase MHC, se transdujeron células HEK293T que expresaban NucLight™ Red nulas para MHC con los 110 MHC más comunes (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT) en pocillos individuales en placas de 96 pocillos. Las células transducidas se seleccionaron con nourseotricina (400 µg/ml) durante una semana. Las células que expresaban los 110 MHC más comunes se pasaron y almacenaron en placas de 96 pocillos como un arreglo. La expresión de los alelos MHC individuales se verificó mediante tinción usando un anticuerpo pan-MHC (BioLegend).

Para generar el control positivo para el ensayo, se transdujeron células HEK293T nulas para MHC con virus IncuCyte® NucLight™ Red (Essen BioScience) y se clasificaron en base a la expresión de NucLight™ Red usando un clasificador Sony SH800. Luego se introdujo HLA-A*01:01 (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT) en las células usando transducción lentiviral. Las células transducidas se seleccionaron con nourseotricina (400 µg/ml) durante una semana. Estas células se transdujeron luego con una construcción ORF (pHAGE-CMV-MAGEA1-EFS-AmCyan) que expresa el ORF de MAGE-A1 que contiene al epítopo $MAGEA1_{161-169}$ (EADPTGHSY). Luego, las células transducidas se clasificaron para determinar la expresión de AmCyan utilizando un clasificador espectral de células Bigfoot (Thermo Fisher Scientific).

iii. Empaquetado y transducción lentiviral

Para empaquetar los lentivirus de las construcciones de expresión de 110 MHC (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT), se sembraron células HEK293T nulas para MHC con una confluencia del 75 % en placas de 96 pocillos y se transfectaron con el reactivo de transfección jetPRIME (Polyplus, Illkirch, Francia). Las construcciones de expresión de MHC individuales se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se agregó medio DMEM 24 horas después de la transfección. Los sobrenadantes virales se cosecharon 48 horas después de la transfección y se usaron para la transducción de los 110 MHC en un formato de matriz basado en 96 pocillos.

Para empaquetar los lentivirus de construcciones control, se sembraron células Lenti-X™ (Takara Bio USA, Mountain View, CA) con una confluencia del 75 % y se transfectaron usando el reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Las construcciones de expresión se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante, y se agregó medio OptiPRO™ SFM 24 horas después de la transfección. Los sobrenadantes virales se cosecharon 48 horas después de la transfección y se concentraron utilizando concentradores centrífugos Vivaspin® 20 o casetes Vivaflow® 50 (Sartorius, Bohemia, NY).

Todas las transducciones virales relacionadas con las líneas celulares derivadas de células HEK293T se realizaron con polibreno (4 µg/ml).

iv. Cocultivo para la determinación del perfil de alorreactividad

Se modificaron células pan T ($CD3^+$) como se describió antes y se congelaron. El día 0, las

células T se volvieron a estimular en frascos T25 verticales con 1,0E+6 células T, 20,0E+6 PBMC irradiadas, IL-2 humana recombinante y anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3) [0,1 ug/ml, eBioscience]. Se intercambió la mitad del volumen de los medios los días 2, 4, 5 y 6 con RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor [FBS], 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e IL-2 humana recombinante [50 U/ml, PeproTech, Cranbury, NJ]. Las células se cosecharon para el ensayo el día 7.

El ensayo se condujo por triplicado. El Día 5, las células diana en el arreglo de 96 pocillos se pasaron y se sembraron en placas de 384 pocillos. El día 6, se agregaron células T CD8+ modificadas que expresan el TCR MAGE-A1-458 recombinante o células T control no transducido a una relación de efector a diana (E:T) de 5:1 y se incubaron con las células diana durante 48 horas. Se midió el número de células diana en el transcurso del tiempo usando IncuCyte®, midiendo el número de células positivas para NucLight™ Red. La inhibición celular a las 48 h por el TCR en cada MHC en el ensayo se calculó como 1-(Duplicación del número de células [Incubadas con células T que expresan TCR MAGE-A1-458]/Duplicación del número de células [Incubadas con células T control no transducidas]).

v. <u>Generación de células T TCR CD8 que expresan MAGE-A1-458 para las pruebas de seguridad</u>

Se descongelaron células T $CD8^+$ que expresan MAGE-A1 458 como se describió antes y se volvieron a estimular (adicionalmente expandidas) mediante cocultivo de las células T con PBMC alogénicas irradiadas (60 Grays) en la presencia de 0,1 ug/ml de anticuerpo anti-CD3 (OKT3, eBioscience) y 50 U/ml IL-2 recombinante (PeproTech) en medio para células T fresco (RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, IL-2 humana recombinante [50 U/ml, PeproTech]) en frascos G-REX® 100 (Wilson Wolf). Se agregó IL-2 recombinante 50 U/ml a las células en expansión día por medio hasta el día 6. El día 6, se reemplazó la mitad del medio de cultivo por medio de células T fresco que contiene IL-2 recombinante 50 U/ml.Las células se usaron en los ensayos el Día 7.

vi. <u>Diseño de una biblioteca de péptidos para la prueba de seguridad</u>

Se generó una biblioteca de péptido de todo el genoma humano mediante generación de mosaicos de las secuencia codificantes del genoma humano que abarca todas las proteínas del genoma humano con superposición de mosaicos de 90-mero de aminoácidos. Los

mosaicos se sintetizaron sobre un chip de silicona (Twist Bioscience) y se clonaron en un vector de expresión lentiviral.

vii. Empaquetamiento y titulación de virus de la biblioteca para la prueba de seguridad

Para generar células informantes que expresan la biblioteca de péptidos, las construcciones de la biblioteca de péptidos se empaquetaron primero utilizando células Lenti-X™ (Takara Bio USA, Mountain View, CA). En resumen, las células Lenti-X™ se plaquearon con una confluencia del 75 % en una cámara CellBIND® de poliestireno CellSTACK® de 5 pilas (Corning) y se transfectaron utilizando el reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Las bibliotecas de péptidos se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) y se incubaron con el reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante. 24 horas después de la transfección se agregó medio Opti-Pro™ SFM (LifeTech). Se recolectaron los sobrenadantes virales 48 horas después de la transfección y se concentraron utilizando casetes Vivaflow® 50 (Sartorius, Bohemia, NY). Se determinó el título lentiviral por formación de colonias en puromicina utilizando células Lenti-X™ con diluciones en serie del sobrenadante viral. Para cuantificar los títulos virales 48 horas después de la transducción se seleccionaron las colonias resistentes a la puromicina. Las colonias resistentes a la pruomicina se visualizaron mediante tinción con violeta cristal y se contaron. Se calculó el título como las unidades formadoras de colonias como TU/ml utilizando la fórmula: TU/ml = número de colonias resistentes a la puromicina x factor de dilución x 1000.

Las células informantes se generaron mediante noqueo de HLA-A/B/C endógenos en células HEK293T usando CRISPR y se modificaron para expresar una proteína fluorescente infrarroja activada con granzima (IFP) y una escramblasa activada con granzima (Ferretti *et al.,* (2020) *Immunity* 53: 1095-1107). Las células informantes para las pruebas se modificaron para que todas expresaran HLA-A*01:01.

Las células informantes se transdujeron con partículas lentiviral para expresar la biblioteca PEP LIB V2SAFEa un valor de MOI de 5 en DMEM completo (1X DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina). Esta biblioteca está compuesta por >500.000 construcciones (mosaicos) compuestos por 90 aminoácidos cada uno, representativo del proteoma humano. El día después de la transducción, se refrescó el medio DMEM completo y las células se mantuvieron en cultivo o

congeladas en DMEM completo suplementado con 10% de DMSO según necesidad.

viii. Cocultivo y enriquecimiento de células muertas por granzima

El día 7 de la expansion de células T, se agregaron células T a las células informantes transducidas con la biblioteca a una relación de E:T de 1:1 y se incubaron a 37 °C durante cuatro horas. Después de la incubación, se recogieron todas las células mediante tripsinización y centrifugación, se resuspendieron las células en regulador de pH de unión a anexina V 1X (Miltenyi Biotec) y se centrifugaron. Se resuspendieron las células con microesferas magnéticas de anexina V (Miltenyi Biotec) en solución amortiguadora de unión a anexina V 1X (1 ml de microesferas en 9 ml de solución amortiguadora de unión a anexina V por 1 x 10^9 células totales) y se incubaron a la temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron con 5 veces el volumen de solución amortiguadora de unión a anexina V y se centrifugaron. Se resuspendieron las células en solución amortiguadora de unión a anexina V y luego se dividieron en 2 "megareps" y se filtraron utilizando un filtro para células de 70 uM (Corning). Las células marcadas con anexina V se seleccionaron positivamente usando un aparato AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec). La elución de cada "megarep" se dividió en cuatro "réplicas" para obtener un total de 8 réplicas técnicas por cribado. Las células IFP^+ se separaron usando un clasificador de células MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter) y se guardaron en DNA/RNA Shield™ (Zymo Research) para el subsiguiente análisis.

ix. Secuenciación de nueva generación (NGS) y análisis de los datos

Se extrajo el ADN genómico con el kit de purificación de ADN genómico GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se preparó para la secuenciación por NGS mediante dos rondas de amplificación por PCR. En resumen, la primera ronda de PCR amplificó el casete de péptido y la segunda ronda agregó el adaptador de secuenciación y los índices de muestra antes de la secuenciación con un instrumento Illumina NextSeq™ (Illumina, San Diego, CA).

Las secuencias de nucleótidos se mapearon a mosaicos de nucleótidos individuales. Se calculó la proporción de recuentos de lectura para cada mosaico para cada réplica de cribado (n = 8) y para la entrada de cada agrupación de células informantes transducidas, y se calcularon los enriquecimientos de cada mosaico dividiendo la proporción del mosaico en la réplica de cribado por la proporción del mosaico en la biblioteca de entrada. Se utilizó una media geométrica modificada del enriquecimiento de un mosaico idéntico a través de las 8 réplicas de cribado para identificar aciertos del cribado reproducibles.

h. Evaluación de la seguridad de TCR MAGE-A1-458 en células primarias humanas sanas

Se cultivaron líneas celulares cancerosas en los medios como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Líneas celulares cancerosas y sus medios de cultivo

Líneas celulares cancerosas	Medio de cultivo
NCI-H1703	RPMI-1640 + HIFBS al 10 % + 1X Pen/Estrep
NCI-H2347	RPMI-1640 + HIFBS al 10 % + 1X Pen/ Estrep
HEK A*01:01	DMEM + HIFBS al 10 % + 1X Pen/ Estrep

i. Células primarias humanas sanas que expresan elementos fuera del objetivo putativos de TCR MAGE-A1

Se descongelaron células primarias de donantes sanos y se cultivaron en los medios que se describen en la Tabla 6 según las instrucciones del proveedor.

Tabla 6. Células primarias humanas sanas y sus medios de cultivo

Células primarias	**N° lote de células**	**Medio de cultivo**
Astrocitos	36730	Medio de astrocitos
Células epiteliales pigmentarias de la retina (RPEC)	29522	Medio de células epiteliales
Células epiteliales corticales renales (RCEpC)	19896	Medio de células epiteliales
Células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas humanas (HSAEpC)	4220Z020, 480Z008.2	Medio de crecimiento de fibroblastos (listo para usar)
Fibroblastos dérmicos normales (NHDF)	486Z033.2	Medio de crecimiento de fibroblastos 2 (listo para usar)
Queratinocitos epidérmicos humanos (NHEK)	489Z017.1	Medio de crecimiento de queratinocitos 2 (listo para usar):
Células endoteliales microvasculares	451Z015.1	Medio de crecimiento de

cardiacos humanos (HCMEC)		células endoteliales MV (listo para usar)
Células endoteliales aórticas humanas (HAoEC)	451Z003.2	Medio de crecimiento de células endoteliales MV (listo para usar)
Células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HPMEC)	490Z022.1	Medio de crecimiento de células endoteliales MV (listo para usar)
Células endoteliales microvasculares cardiacas humanas (HUVEC)	452Z009	Medio de crecimiento de células endoteliales (listo para usar)
Células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC)	447Z026.1	Medio de crecimiento de célula endotelial MV (listo para usar)
Fibroblastos pulmonares humanos (HPF)	486Z027.1	Medio de crecimiento de fibroblastos 2 (listo para usar)
Fibroblastos cardíacos humanos (HCF)	450Z022.1	Medio de crecimiento de fibroblastos 3 (listo para usar)
Células musculares lisas uterinas (HUtSMC)	471Z016.2	Medio de crecimiento de células de músculo liso 2 (listo para usar)

ii. <u>Ensayo con citoquinas para la evaluación de la seguridad de TCR-MAGE-A1-458</u>

Se usaron células HLA-A*01:01^{+}MAGE-A1^{+} NCI-H1703como control positivo y se usaron células HLA-A*01:01^{+}MAGE-A1^{-} NCI-H2347o HEK A*01:01 como control negativo. A las 24 horas antes de los ensayos de cocultivo, se desprendieron células NCI-H1703 y NCI-H2347 o HEK A*01:01 de sus frascos de cultivo usando el reactivo TrypLE, se lavaron con medio y se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo y se dejó que se adhieran durante la noche. A las 24 horas antes de los ensayos de cocultivo, se desprendieron las células Astrocitos, RPEC, RCEpC, HSAEpC, NHDF, NHEK, HCMECs, HAoECs, HPMECs, HUVECs, HCAECs, HPFs, HCFs, NHDFs, HSAEpCs y HUtSMCs de sus frascos de cultivo usando el kit Detach (PromoCell, Alemania),

se lavaron y se plaquearon en sus respectivos medios a una densidad de 25.000 células/pocillo. Al día siguiente, las células diana primarias se pulsaron con el péptido MAGE-A1 100 ng/ml durante 2 horas se dejaron sin pulsar en sus respectivos medios. Después de los pulsos de péptidos, los pocillos se lavaron cuidadosamente tres veces con el medio de las células T. A continuación, se agregaron células TCR-MAGE-A1-458 o NTD a una densidad de 50.000 células/pocillo en medio completo para células T sin citoquinas. Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 horas después del cultivo y se congelaron a -80 °C. Los sobrenadantes se descongelaron y se analizaron para determinar los niveles de IFN-gamma cargándolos en un cartucho Simple Plex™ Human IFN-gamma (3a. Gen) (ProteinSimple, San José, CA) utilizando el instrumento Ella™.

i. Materiales

Tabla 7

Líneas celulares

• Lenti-X™: Takara Bio USA, 632180
• Células HEK293T: ATCC, CRL-3216
• NCI-H1703: ATCC CRL-5889
• A-375: ATCC CRL-1619
• NCI-H2347: ATCC, CRL-5942

Células primarias humanas saludables

• Astrocitos: ScienCell, 1800 (n.º de lote 36730)
• Células del epitelio pigmentario de la retina (RPEC): ScienCell, 6540 (n.º de lote 29522)
• Células del epitelio pigmentario cortical de la retina (RCEpCs): ScienCell, 4110 (n.º de lote 19896)
• Células epiteliales de la superficie de las vías respiratorias pequeñas humanas (HSAEpCs): PromoCell, C-12642, (n.º de lote 422Z020 y 480Z008.2)
• Fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF): PromoCell, C-12302, (n.º de lote 486Z033.2)
• Queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK): PromoCell, C-12003, (n.º de lote 489Z017.1)

- Células endoteliales microvasculares cardiacas humanas (HCMEC): PromoCell, C-12285, (n.º de lote 451Z015.1)
- Células endoteliales aórticas humanas (HAoEC): PromoCell, C-12271, (n.º de lote 451Z003.2)
- Células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HPMEC): PromoCell, C-12281, (n.º de lote 490Z022.1)
- Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC): PromoCell, C-12205, (n.º de lote 452Z009)
- Células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC): PromoCell, C-12221, (n.º de lote 447Z026.1)
- Fibroblastos pulmonares humanos (HPF): PromoCell, C-12360, (n.º de lote 486Z027.1)
- Fibroblastos cardiacos humanos (HCF): PromoCell, C-12375, (n.º de lote 450Z022.1)
- Células musculares lisas uterinas humanas (HUtSMC): PromoCell, C-12575, (n.º de lote 471Z016.2)

Medios y complementos

- X-VIVO™ 15, medio de células hematopoyéticas libres de suero, con L-Glutamina, gentamicina y rojo fenol: Lonza, 04-418Q
- Suero AB masculino humano (inactivado con calor): Sigma Aldrich, H3667-100ML
- Penicilina estreptomicina: Gibco, 15149-122
- Complemento GlutaMAX™: Fisher Scientific, 35050061
- Medio RPMI-1640: ATCC, 30-2001
- DMEM (1x) [+] 4,5 g/L D-glucosa, [+] L-glutamina, [-] piruvato de sodio: Gibco, 11965
- medio DMEM (1X) [+] D-glucosa 4,5 g/L, [+] L-glutamina, [+] bicarbonato de sodio 3,7 g/L: Thermo Fisher Scientific, 11965084
- IMDM: ATCC, 30-2005
- Medio SFM OptiPRO™: Thermo Fisher Scientific, 12309019

• Medio EMEM: ATCC, 30-2003 • Suero bovino fetal (FBS), inactivado con calor: Gibco, A3840102 • Medio de astrocitos: ScienCell, AM, 1801 • Medio de células epiteliales: ScienCell, EpiCM, 4101 • Medio de crecimiento de fibroblastos 2 (listo para usar): PromoCell, C-23020 • Medio de crecimiento de queratinocitos 2 (listo para usar): PromoCell, C-20011 • Medio de crecimiento de células endoteliales MV (listo para usar): PromoCell, C-22020 • Medio de crecimiento de células endoteliales (listo para usar): PromoCell, C-22010 • Medio de crecimiento de fibroblastos 2 (listo para usar): PromoCell, C-23020 • Medio de crecimiento de fibroblastos 3 (listo para usar): PromoCell, C-23025 • Medio de crecimiento de células musculares lisas (listo para usar): PromoCell, C-22062 • Medio de crecimiento de células endoteliales de las vías respiratorias pequeñas (listo para usar): PromoCell, C-21070
• DetachKit: PromoCell, C-41220 • TrypLE™ Express: Thermo Fisher Scientific, 12605-010 • Poli-l-lisina: ScienCell, 0413 • Agua de grado de cultivo celular: Corning, 25-055-CI

Péptidos

• MAGE-A1 (EADPTGHSY): GenScript

Amortiguación

• DPBS (sin Ca2+/Mg2+): Gibco, 14190-122 • Amortiguador EasySep™: StemCell Technologies, 20144

Citocinas de células T

• IL-2 humana recombinante: Sigma Aldrich, 11147528001

- IL-7 humana recombinante: R&D Systems, 207-IL-025
- IL-2 humana recombinante: PeproTech, 200-02
- IL-7 humana recombinante: R&D Systems, 207-IL-005
- IL-15 humana recombinante: R&D Systems, 247-ILB-005

Citocinas DC:

- GM-CSF humano recombinante: R&D Systems, 215-GM-050
- IL-4 humana recombinante: R&D Systems, 204-IL-050
- TNF α humano recombinante: R&D Systems, 210-TA-050
- IL-1β/IL-1F2 humana recombinante: R&D Systems, 201-LB-025
- IL-6 humana recombinante: R&D Systems, 206-IL-050

Kits

- Cartucho de IFN-gamma humano Simple Plex™ (3.ª Gen): ProteinSimple, SPCKB-PS-002574
- Kit de aislamiento de células T humanos EasySep™: StemCell Technologies: 17951
- Kit de aislamiento de células T CD8+ humanos no activados EasySep™ II: STEMCELL Technologies, 17968
- Kit de selección positiva de CD14 humanos EasySep™ II: STEMCELL Technologies, 17858
- Kit Ella™ Simple Plex™ para 32 muestras: ProteinSimple, SPCKB-PS-003027

Anticuerpos y reactivos de tinción:

- Anticuerpo monoclonal CD3 (OKT), grado funcional: eBioscience 16-0037-81
- CD8α antihumano PerCp-Cy5,5 (clon: HIT8a): BioLegend: 300924
- CD4 antihumano APC-Cy7 (clon: OKT4): BioLegend: 317418
- CD56 antihumano PE (clon: 5.1H11): BioLegend: 362508
- CD57 antihumano PE (clon: HCD57): BioLegend: 322312
- CD34 antihumano Alexa Fluor 488: (Clon: QBEND/10): R&D Systems, FAB7227G

- HLA-A2 antihumano PE (clon: BB7.2): BioLegend, 343306
- TCRα/β PE-Cy7 antihumano (clon: IP26): BioLegend: 306720
- Anticuerpo APC HLA-A,B,C antihumano: BioLegend, 311410
- Tinte de Viabilidad Fijable eFluor 660 (canal APC) Thermo Fisher Scientific: 65-0864-14
- DAPI: Thermo Scientific: Thermo Scientific, 62248
- Cytofix™: BD Biosciences, 554655

Dextrámeros

- Dextrámero de MAGEA1$_{161-169}$ EADPTGHSY HLA-A*01:01: Immundex

CRISPR-Cas9 y reactivos de electroporación

- Alt-R® S.p. Nucleasa Cas9 V3 (n.º de lote 0000417827): IDT, 1081059
- ARNtracr CRISPR-Cas9 Alt-R® (n.º de lote 0000415438): IDT, 1072534
- Unidad de núcleo 4D-Nucleofector™: Lonza, AAF-1002B
- Unidad X 4D-Nucleofector™: Lonza, AAF-1002X
- Kit L de 4D-Nucleofector™ X de la línea celular SE: Lonza V4XC-1012

Placas para el cultivo de tejido:

- Placa de 24 pocillos G-REX®: Wilson Wolf, 80192M
- Placa de 6 pocillos G-REX®: Wilson Wolf, 80240M
- Placa de 96 pocillos VECELL®: Cosmo Bio Co., VCL-V96WGPB-10-EX
- Placa de 6 pocillos tratadas con TC: Corning Costar, 3506
- Placas de 24 pocillos tratadas con TC: Corning Costar, 3524
- Placas de fondo plano de 96 pocillos: Corning Costar, 3595
- Placas de fondo plano de 384 pocillos: Corning Costar, 3764
- Placa de fondo redondo de 96 pocillos recubierta con Colágeno I CellAdhere™: StemCell Technologies, 100-0366

Empaque y reactivos de producción de lentivirus

- Lenti-X™ GoStix Plus: Takara, 631281
- Reactivo de transfección jetPRIME®: Transfección Polipus, 114-75
- Vivaspin® 20: Sartorius, VS2041
- casetes Vivaflow®: Sartorius, VF05P4

Otros reactivos

- Activador de células T CD3/CD28/CD2 humanos ImmunoCult™ StemCell Technologies, 10970
- Solución de poli-L-ornitina al 0,01 %: Millipore-Sigma, P4957-50ML
- CryoStor® CS10: StemCell Technologies, 07930
- Solución de tinción AO/PI en PBS ViaStain™: Nexcelom Bioscience, CS2-0106-5mL
- Nourseotricina: GoldBio, N-500-1
- Puromicina: Gibco, A11138-03
- Mirus TransIT, Mirus Bio MIR 2704
- Polibreno: EMD Millipore, TR-1003-G
- Reactivo de lentivirus NucLigth Rojo Incucyte® (promotor alfa EF-1, selección de puromicina), Sartorius, 4476

Anticuerpos (todos los anticuerpos son de BioLegend):

- CD8α antihumano PerCp-Cy5,5 (clon: HIT8a): BioLegend, 300924
- CD56 antihumano PE (clon: 5.1H11): BioLegend, 362508
- CD57 antihumano PE (clon: HCD57): BioLegend, 322312
- CD45RO antihumano FITC (clon: UCHL1): BioLegend, 304204
- APC RA CD45 antihumano (clon: HI100): BioLegend, 304112
- CCR7 antihumano BV605 (clon: G043H7): BioLegend, 353224
- CD14 antihumano Alexa Fluor 488® (clon: M5E2): BioLegend, 301811
- CD83 antihumano PE-Cy7 (clon: HB15e): BioLegend, 305326
- HLA-A2 antihumano PE (clon: BB7.2): BioLegend, 343306
- CD80 antihumano APC (clon: 2D10): BioLegend, 305220
- CD86 anti-humano Brilliant Violet 605 ™ (clon IT2.2): BioLegend, 305430

- TCRα/β FITC antihumano (clon: IP26): BioLegend, 221058
- DAPI: Thermo Scientific: Thermo Scientific, 62248
- Cytofix™: BD Biosciences, 554655

Preparación de reactivos:

- Medio de células T: X-VIVO™ o LymphoONE™ con suero humano al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y 1x GlutaMAX™
- Amortiguador de dextrámeros: PBS + BSA al 1 %

Reactivos de 10x Genomics

- Kit de genoteca 5' unicelular Chromium y perlas de gel v1: 10x Genomics, PN1000006
- Kit de enriquecimiento unicelular Chromium V(D)J, células T humanos: 10x Genomics, PN1000005
- Kit unicelular chip A Chromium: 10x Genomics, PN1000152
- Kit de índice único T conjunto A: 10x Genomics, PN1000213
- Kit de reactivo SPRIselect: Beckman Coulter, B23318
- ScreenTape D5000 de alta sensibilidad: Agilent Technologies, 5067-5592
- Reactivos D5000 de alta sensibilidad: Agilent Technologies, 5067-5593
- Kit de ensayo de ADNbc HS Qubit™: Invitrogen, Q32854

Ejemplo 2: Se identificaron 1181 TCR restringidos por MAGEA1-A*01:01 y se seleccionó un subconjunto de 14 TCR restringidos por MAGEA1-A*01:01 que tienen una alta expresión y afinidad.

Se identificaron y validaron TCR específicos de MAGE-A1 para el epítopo restringido de HLA-A*01:1, MAGE-$A1_{161-169}$ (EADPTGHSY).. En particular, se identificaron 1181 TCR específicos para MAGE-$A1_{161-169}$ utilizando una plataforma que se representa en las Figuras 1A y 1B. En resumen, se aislaron monocitos $CD14^+$ de PBMC de donantes sanos HLA-A*01:01 el día -4 y se diferenciaron en DC maduras. El día -1, se aislaron células T CD8 naïve de PBMC autólogas y se dejaron reposar durante toda la noche. El cocultivo de células T CD8 y DC naïve se realizó después de 3 horas de la pulsación de las DC con 1 µg/ml de péptido MAGE-

$A1_{161-169}$ como parte de los cribados multiplexados, seguido de una fase de expansión celular de 11 días. La tinción con dextrámero se realizó con dextrámero MAGE-$A1_{161-169}$ específico de HLA-A*01:01 para identificar los clones. Se utilizaron dextrámeros con códigos de barras de ADN para aislar células específicas de MAGE-$A1_{161-169}$. Los pares de TCR alfa y beta se identificaron mediante la plataforma Genomics 10X.

Las Figuras 2A y 2B muestran que los 14 TCR restringidos a MAGEA1-A*01:01 que tienen una alta expresión y afinidad se seleccionaron para análisis adicional.

Ejemplo 3: Se seleccionaron adicionalmente TCR restringidos por MAGEA1-A*01:01 para evaluaciones funcionales.

Se transdujeron células T pan aislados de PBMC de donantes positivos para HLA-A*01:01 saludable para expresar TCR específicos para MAGEA-1 individualmente, junto con "TCR comparador" y se evaluaron para determinar respuestas funcionales a células objetivas positivas y negativas para MAGEA1 y HLA-A*01:01. Las células T modificados se cocultivaron con células objetivo etiquetadas con NucLight® rojo, tales como células NCIH1703, A101D y A375, a relaciones E:T indicadas, y su supervivencia se cuantificó en un IncuCyte® como una lectura de la citotoxicidad de las células T. Se muestra la respuesta funcional de los 14 TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ a líneas celulares objetivo HLA-A*01:01$^+$ MAGEA1$^+$ NCIH1703 y A101D (Figura 3A), (B) A375 (Figura 3B) y la línea celular de control negativo HLA-A*01:01$^+$ MAGEA1 HEK293T (Figura 3B). Las curvas de supervivencia para los 5 mejores TCR entre los 14 TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ que indican una citotoxicidad particularmente potente se muestran en la Figura 3C y la Figura 3D (es decir, Figuras 3C y Figura 3D muestran resultados de los mismos estudios con el uso de dos donantes de células T diferentes utilizados para modificar células T). Las células no transducidas (NTD), una línea celular de control negativo HEK293T y un TCR comparador sirvieron como controles. Además, se muestran las respuestas funcionales de la secreción de IFN-γ en sobrenadantes del cocultivo a las 24 h (E:T 1:1) de los TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ a líneas celulares objetivo HLA-A*01:01$^+$ MAGEA1$^+$ (Figura 3E). La Figura 3F muestra que TCR 458 demuestra los resultados más potentes en los ensayos de titulación de péptidos. Además, las gráficas de puntos muestran la expresión de los TCR específicos para $MAGEA1_{161-169}$ como se evalúan mediante la tinción de dextrámeros de $MAGEA1_{161-169}$ específicos para A*01:01 (Figura 3G).

Ejemplo 4: Eficacia *in vivo* de TSC-204-A0101

Se evaluaron la actividad antitumoral *in vivo* de células T-TCR TSC-204-A0101 preparados como se describen en el Ejemplo 1 anterior y administrados de forma subcutánea en un modelo de cáncer representativo (modelo de xenoinjerto de H1703 en ratones NCG hembra). La Figura 4 muestra la eficacia *in vivo* de células T-TCR TSC-204-A0101.

Ejemplo 5: Cribado de todo el genoma de elementos fuera del objetivo para TCR MAGE-A1-458 identificó elementos fuera del objetivo, que fueron excluidos experimentalmente

Los datos de análisis de todo el genoma de TCR MAGE-A1-458 identificaron cinco potenciales elementos fuera del objetivo en un análisis de > 500.000 fragmentos de proteínas que abarcaron cada proteína humana de tipo salvaje (w.t.) (Figura 5A). El cribado fue diseñado para predecir un exceso de elementos fuera del objetivo por sobreexpresión de fragmentos de proteínas de 90 aa, que se procesan de manera más eficiente que las proteínas de longitud completa. Los elementos fuera del objetivo putativos se identificaron mediante nombres de genes (Figura 5B). Los elementos fuera del objetivo putativos MAGEA10 y MAGEA11 contienen secuencias que son ampliamente similares al epítopo MAGEA1. Las células objetivo se pulsaron con el péptido MAGE-A1$_{161-169}$ o los péptidos MAGEA10 o MAGEA11 similares y cocultivados con células MAGE-A1-458. Se transdujo el ORF de MAGE10 de longitud completa, que contiene el epítopo putativo con una similitud estrecha con el epítopo MAGEA1$_{161-169}$ en células objetivo positivas para A0101 negativas para MAGEA1 y cocultivaron con células T MAGE-A1-458. Luego de 24 horas de cocultivo, la secreción de IFNγ en los sobrenadantes del cultivo se utilizó como una lectura de la reactividad de MAGE-A1-458 a las células objetivo que expresan el péptido pulsado o el ORF. La Figura 6A y la Figura 6B brindan datos que confirman que el TCR MAGE-A1-458 no muestran la reactividad a los péptidos no objetivo putativos para MAGE-A10 y MAGE-A11.

Ejemplo 6: El TCR MAGE-A1-458 no muestra reactividad a células primarias humanas saludables

Se evaluaron células T pan que expresan MAGE-A1-458 o células NTD para determinar su reactividad a células primarias derivadas de donantes humanos HLA-A*01:01+ saludables que expresan naturalmente los elementos fuera del objetivo identificados en el análisis de seguridad en todo el genoma (Figura 7). Se pulsaron células objetivo con el péptido MAGE-A1$_{161-169}$ (EADPTGHSY) o se dejaron sin pulsar, y se cocultivaron con células MAGE-A1-458 o NTD. La secreción de IFNγ en los sobrenadantes del cultivo se utilizó como una lectura de la

reactividad de MAGE-A1-458 a células objetivo. Se utilizaron células HLA-A*01:01^{+}MAGE-A1^{+} NCI-H1703 como control positivo y se utilizaron células HLA-A*01:01^{+}MAGE-A1^{-} HEK como controles negativos.

Ejemplo 7: TCR MAGE-A1-458 no muestra alorreactividad a 110 MHC evaluados

Se cocultivaron durante 48 horas células pan T que expresaban TCR MAGE-A1-458 o células T de control no transducidas con células HEK293T nulas para MHC que reexpresan uno de los 110 MHC de clase I que se encuentran con mayor frecuencia en la población de EE.UU. En la selección se incluyó un control positivo que consiste en células HEK293T que expresan tanto HLA-A*01:01 como el ORF MAGE-A1 que contiene el péptido MAGE-A1$_{161-169}$ (EADPTGHSY). La inhibición del crecimiento de las células diana por parte de las células TCR que expresan MAGE-A1-458 con relación a la de las células T de control no transducidas se midió después de 48 horas de cocultivo como una lectura de la reactividad del TCR frente a moléculas alogénicas de MHC. Se indica el % de inhibición de células diana para cada alelo con relación al control positivo (Figura 8).

De esta manera, la presente descripción demuestra la identificación de 1181 TCR específicos para un epítopo derivado de MAGE-A1 restringido por A*01:01 con el uso de una plataforma ReceptorScan. Luego de la selección de TCR específicos para MAGE-A1 con expresión alta y avidez alta con el uso de una tecnología de análisis ActivScan a base de activación, se evaluaron 14 TCR para determinar su función citotóxica y 5 TCR se seleccionaron que se compararon favorablemente con el TCR de referencia en etapa clínica para determinar al citotoxicidad y la liberación de citocina. Estos TCR se caracterizaron funcionalmente con el uso de un panel de MAGE-A1 que expresan líneas celulares positivas para A*01:01 y un modelo de ratón con xenoinjerto. Se evaluaron TCR seleccionados para determinar la reactividad fuera del objetivo potencial con el uso de la plataforma SafetyScan, que evalúa el reconocimiento de antígenos a partir de todas las proteínas que comprenden el proteoma humano. Se llevaron a cabo análisis de seguridad adicionales mediante la examinación de la alorreactividad a HLA de clase I de alta frecuencia y mediante la evaluación de la reactividad de TCR a células y líneas celulares humanas primarias normales. Las evaluaciones de seguridad demostraron que pocos péptidos fuera del objetivo putativos fueron reconocidos, se observó una alorreactividad mínima a 110 alotipos evaluados y no se observó ninguna reactividad a líneas celulares negativas objetivo.

Ejemplo 8: Caracterización confirmatoria adicional de la acción de TSC-204-A0101

Los siguientes Ejemplos 8-12 representativos confirman adicionalmente los datos y resultados presentados en los Ejemplos 1-7 y continúan basándose, en parte, en el reconocimiento de que la transferencia celular adoptiva con células T genéticamente modificadas es muy prometedora para el tratamiento de tumores sólidos. Los pacientes positivos para alelos HLA particulares de interés, como HLA-A*01:01, son susceptibles de tratamiento con TCR que reconocen epítopos de una diana determinada presentada por dichos HLA, como TSC-204-A0101.

Para los Ejemplos 8-11 representativos, se modificaron células T-TCR TSC-204-A0101 representativas del proceso (por ejemplo, células T auxiliares ($CD4^+$, ahora $CD8^+/CD4^+$) y citotóxicas ($CD8^+$)) mediante la administración de genes mediada por transposón/transposasa del vector pNVVD236 (es decir, pNVVD236_TSC-204-A01_TCR-458_MSCV-TCR-458-CD8-EF1α-dnTGFbRII-DHFR, como se muestra en la Figura 24) (a no ser que se indique otra cosa), para que expresen (1) un TCR recombinante (por ejemplo, el TCR recombinante específico del péptido EADPTGHSYderivado de MAGE-A1 presentado en HLA-A*01:01), (2) correceptores recombinantes CD8α y CD8β para maximizar la eficacia del producto terapéutico, (3) una marca de epítopo derivado de CD34 fusionada por el extremo N-terminal de CD8α para facilitar el seguimiento de las células modificadas *in vitro* e *in vivo*, (4) una forma mutada de la proteína dihidrofolato reductasa (DHFRdm) para facilitar el enriquecimiento de las células modificadas durante el proceso de elaboración, y (5) un receptor TGFβ de tipo II dominante negativo (DN-TGFβRII) para abordar la inmunosupresión mediada por el microambiente tumoral. Dichas células se pueden obtener mediante técnicas conocidas y, en el presente ejemplo, se generaron mediante aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de un producto de aféresis fresco, la administración de ARNm de transposasa y ADNnp de un transposón vectorial por electroporación, la activación y cultivo de células T, enriquecimiento de las células modificadas por adición de metotrexato (MTX) en el medio de cultivo (ventaja de crecimiento selectivo de las células modificadas conferida por la expresión de DHFRdm a partir del vector transposón), lavado de las células para eliminar el MTX, expansión del cultivo, y lavado del cultivo, formulación, criopreservación.

Se analizaron las células T-TCR TSC-204-A0101 mediante citometría de flujo para

caracterizar la composición celular. Las células T-TCR TSC-204-A0101 clínicamente representativas contienen células T auxiliares ($CD4^+$, ahora $CD4^+/CD8^+$) y citotóxicas ($CD8^+$) modificadas (es decir, $CD34^+$). Las células T auxiliares y citotóxicas modificadas expresan el TCR recombinante capaz de reconocer el péptido EADPTGHSYderivado de MAGE-A1 unido a HLA-A*01:01, como lo demuestra la unión del dextrámero relevante. Las células T-TCR modificadas genéticamente también expresan DN-TGFβRII.

Se generaron datos funcionales para caracterizar el mecanismo de acción de TSC-204-A0101. Los datos demuestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 clínicamente representativas de por lo menos 3 lotes (sujetos) independientes reaccionan al péptido EADPTGHSY derivado de MAGE-A1 de una manera dependiente de la dosis cuando se presentan mediante células diana en el sistema HLA-A*01:01 MHC en experimentos de pulsos peptídicos. Se analizó la reactividad de tres lotes independientes y representativos de células T-TCR generadas a partir de diferentes donantes frente a su péptido cognato/MHC. Como se describe más adelante, las células T-TCR TSC-204-A0101 se cocultivaron con células NCI-H1395 pulsadas con péptidos. Las células NCI-H1395 se pulsaron con una titulación del péptido EADPTGHSYderivado de MAGE-A1 y la reactividad del TCR se determinó mediante la citotoxicidad dependeinte de la dosis del péptido contra las células NCI-H1395 durante 4 días de cocultivo. Este estudio confirmó que TSC-204-A0101 reacciona específicamente a las células que presentan el péptido EADPTGHSY derivado de MAGE-A1 presentado en HLA-A*01:01.

Cuando se encuentran con una célula diana que expresa naturalmente MAGE-A1 y HLA-A*01:01, las células T-TCR TSC-204-A0101 segregan citoquinas proinflamatorias y de granzima B y montan una respuesta proliferativa detectada tanto en el sistema citotóxico modificado como en subpoblaciones de células T auxiliares. Las células T-TCR finalmente matan a estas células diana que presentan de manera natural el péptido derivado de MAGEA1 EADPTGHSY en HLA-A*01:01. Aquí, se utilizó un panel de líneas celulares cancerosas diana que expresan MAGE-A1 y HLA-A*01:01 de forma natural en ensayos de cocultivo con los 3 lotes independientes de células T-TCR TSC-204-A0101 para evaluar los resultados biológicos relacionados con la participación de TSC-204-A0101. Las células T control no transfectadas (UTF) obtenidas de donantes compatibles se utilizaron como controles negativos. También se produjeron células T control no transfectadas (UTF) a partir

de las PBMC aisladas utilizadas para generar cada lote de material representativo del proceso TSC-204-A0101 probado. Las células UTF no se sometieron a electroporación ni el enriquecimiento a base de MTX, pero se activaron y cultivaron de manera similar a las células T-TCR TSC-204-A0101. Como controles negativos adicionales se utilizaron células diana positivas para la expresión de HLA-A*01:01 pero negativas para MAGE-A1. Se utilizaron múltiples lecturas para evaluar la participación funcional de las células T-TCR, que incluyeron: (1) la secreción de citoquinas proinflamatorias (IFN-γ, TNF-α e IL-2) y se evaluó la granzima B en el sobrenadante del cocultivo después 20-24 horas pos cocultivo; (2) se evaluó la proliferación de células T modificadas (tanto $CD8^+CD4^+$ como $CD8^+CD4^-$) después de ~4 días poscocultivo; y (3) se examinó la actividad citotóxica selectiva durante 4 días de cocultivo (se incluyen datos representativos de 72 horas).

Además, las células T-TCR TSC-204-A0101 exhibieron una inducción fosfo-SMAD2 reducida luego de la exposición a TGFβ, lo que demuestra que la expresión del receptor de TGFβ de tipo II negativo dominante en células T-TCR TSC-204-A0101 genera resistencia a la señalización de TGFβ en células T-TCR TSC-204-A0101. La capacidad de las células T-TCR que expresan DN-TGFβRII de resistir la señalización de TGFβ se evaluaron mediante la demostración de una fosoforilación de SMAD2 reducida luego de la estimulación de células T-TCR con niveles fisiológicos de TGFβ-1.

En la presente se describen los materiales y métodos para preparar células T efectoras y las células diana, así como para establecer los cocultivos. Se descongelaron células T en un baño de agua a 37 °C y se lavaron una vez con medio de células T libre de citoquinas para eliminar los reactivos de crioconservación antes de resuspenderlas en medio de células T completo. Luego, las células T se sembraron en una placa G-REX® de 6 pocillos a una densidad de 1-2E6 células vivas/ml y se permitió que se recuperaran en una incubadora humidificada a 37 °C y 5% de CO2 durante 16-24 horas antes del cocultivo. Luego de la recuperación, las células T se cosecharon, se lavaron y se resuspendieron en medio de células T sin citoquinas a la densidad celular dependiente del ensayo. Llas células diana se prepararon de manera similar.

Las células diana se prepararon de manera similar (Tabla 8). Por ejemplo, las líneas de células diana se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se lavaron una vez con su medio de cultivo celular respectivo para eliminar los reactivos de criopreservación.

Subsiguientemente, las células se resuspendieron en medio de cultivo celular y se cultivaron según procedimientos estándar en matraces de 75 cm^2 en una incubadora humidificada a 37 °C y 5% de CO_2. Las células se mantuvieron en un estado subconfluente, en la fase de crecimiento exponencial y se hicieron pasajes una o dos veces por semana según fuese necesario. Las líneas de células cancerosas se mantuvieron en cultivo por lo menos un pasaje y no más de 3-4 semanas antes del inicio del cocultivo con células T. Las células objetivo se colocaron en placas un día antes de colocar los cocultivos a una densidad celular dependiente del ensayo.

En la siguiente discusión se describen algunos de los experimentos y resultados que se presentaron precedentemente.

a. Análisis por citometría de flujo de células T-TCR TSC-204-A0101 representativas del proceso. Primero se examinó la composición celular de las células T-TCR TSC-204-A0101 mediante citometría de flujo. Los elementos de prueba representativos del proceso y sus controles compatibles con el donante no transfectados (UTF) fueron descongelados, como se describió anteriormente. Después de una recuperación durante la noche, todas las células T se lavaron, se marcaron con anticuerpos del "Panel de dextrámeros" (Tabla 8) y se adquirieron. También se prepararon células sin teñir, controles de tinción individuales y controles FMO.

Tabla 8. Células cancerosas, medios, “Panel de dextrámeros” de citometría de flujo y reactivos de detección de la proliferación de células T, y reactivos adicionales, respectivamente

Reactivos para células cancerosas

Línea celular	**Tejido**	**Indicación**	**Fuente**	**HLA-A*01:01 (TPM)**	**MAGE-A1 (TPM)**
NCI-H1703	pulmón	Carcinoma de células escamosas	ATCC	+ (555,28)	+ (877,93)
A101D	Piel	Melanoma	ATCC	+ (425,92)	+ (252,73)
A375	Piel	Melanoma maligno	ATCC	+ (40,73)	+ (279,93)
NCI_H1395	pulmón	Adenocarcinoma	ATCC	+ (2418,35)	- (0,26)

Reactivos en el medio

Medio	Componentes	Solución madre V (mL)	Número de catalogo	Notas
Medio de células T libre de citocinas	X-VIVO 15	1000	Lonza #04-418Q	Expira 30 días luego de la preparación
	Suero humano (inactivado por calor)	50	Sigma-Aldrich #H3667-100	
	Pen-Estrep	10	Gibco #15149-122	
	GlutaMAX (100x)	10	FisherScientific #35050061	
	Total	**1070**	n/c	
Medio de células T completo	Medios de células T libre de citocinas	200	n/c	No almacenar; preparar y usar fresco
	IL-2 humano (5ug/mL)	1	Sigma-Aldrich #11147528001	
	IL-7 humano (1umg/mL)	0,1	R&D Systems #207-IL-025	
	Total	**201,1**	n/c	
Medio a base de RPMI (NCI-H1703, NCI-H1395)	RPMI	500	Thermofisher Scientific #11965092	Expira 30 días luego de la preparación
	Suero fetal bovino	50	Thermofisher Scientific #A3840001	
	Penicilina/estreptomicina	10	Thermofisher Scientific #15149-	

			122	
	Total	**560**	NA	
Medio a base de DMEM (A101D, A375)	DMEM	500	Thermofisher Scientific #11965092	Expira 30 días luego de la preparación
	Suero fetal bovino	50	Thermofisher Scientific #A3840001	
	Penicilina/estreptomicina	5	Thermofisher Scientific #15149-122	
	Total	**560**	NC	

Reactivos del “panel de dextrámeros” para citometría de flujo

Anticuerpo	**Clon**	**Proveedor**	**Fluorocromo**	**Número de catalogo**
Tinte reactivo fluorescente casi IR	N/A	Invitrogen	Casi IR (APC-Cy7)	L34976A
CD34	QBEND/10	Invitrogen	Biotinilado	MA5-16924
Estreptavidina	N/A	BioLegend	AF488	405235
CD4	RPA-T4	BioLegend	PE-Cy7	300512
CD8b	2ST8.5H7	BD Bioscience	BV421	568373
TGFβRII	W17055	BioLegend	PE	399704
Dextrámero	N/A	Immudex	APC	WA05257 AP 150

Reactivos de pulsado de péptidos

Péptido	Secuencia de péptidos	Peso bruto	Pureza	Proveedor	Número de catalogo

MAGE-A1	EADPTGHSY	2,0 mg	91,5 %	GenScript	U1678DPBG0-1/PE1542

Reactivos de detección de la proliferación de células T

Reactivo	**Clon**	**Proveedor**	**Fluorocromo**	**Número de catalogo**
Tinte Live-Dead de fijación Far Red	N/A	Thermofisher Scientific	APC equivalente	L34974
CD34	QBEND/10	R&D Systems	Alexa Flúor 488	FAB7227G
TCR α/β	IP26	Biolegend	PE-Cy7	306720
CD4	OKT4	Biolegend	APC-Cy7	317418
CD8	HIT8α	Biolegend	PerCP-Cy5,5	300924
CellTrace Violet (CTV)	NC	Thermofisher Scientific	PB450	C34557

Reactivos phospho-flow

Anticuerpo	**Clon**	**Proveedor**	**Fluorocromo**	**Número de catalogo**
CD34 humano	QBEND10	R&D Systems	Alexa Fluor® 488	FAB7227G
mAb de conejo Phospho-SMAD2 (Ser465/Ser467)	E8F3R	CST	Conjugado Alexa Fluor® 647	68550S
mAb de conejo SMAD2 XP®	D43B4	CST	Conjugado Alexa Fluor® 647	67617S
Reactivo		**Proveedor**		**Número de catalogo**
Factor de crecimiento de		R&D Systems		7754-BH-025/CF

transformación humano β1 (hTGF-β1) (25 ug)		
Amortiguador de reconstitución 3 (HCl)	R&D Systems	RB03
Amortiguado I BD Phosflow Fix	BD	557870
Metanol (99,8 %) (125 mL)	CST	13604S
Amortiguador de dilución de anticuerpos para citometría de flujo (125 mL)	CST	13616S
Kit de tinción celular LIVE/DEAD™ Fixable Yellow, para excitación 405 nm	Invitrogen	L34959

Reactivos adicionales

Anticuerpo	**Clon**	**Proveedor**	**Fluorocromo**	**Número de catalogo**
fluorescente casi IR tinte reactivo	N/A	Thermofisher Scientific	Casi IR (APC-Cy7)	L34976A
Tinte Live/DeadTM Far Red	N/A	Thermofisher scientific	IR lejano	L34973
CD34	QBEND/10	Thermofisher Scientific	Biotinilado	MA5-16924
Estreptavidina	N/A	BioLegend	Alexa488	40235
CD4	RPA-T4	BioLegend	PE-Cy7	300538
CD4	Okt4	BioLegend	APC-Cy7	317418
CD8b	2ST8.5H7	BioLegend	BV421	742390
CD8	Hit8a	Biolegend	Percp-Cy5	300924
TGFβRII	W17055	BioLegend	PE	399704

MAGE-A1/HLA-A*01:01 Dextrámero	MAGE-A1 (XXX-XXX)	IMMUDEX	APC	personalizado (HLA-A*01:01/ EADPTGHSY)
TCRαβ	IP26	BioLegend	PE-Cy7	306720
Perlas de conteo Count BrightTM Absolute	N/A	Thermofisher scientific	N/A	C36950
UltraComp ebeadsTM plus	N/A	Thermofisher scientific	N/A	01-33333-42
CD34 humano	QBEND10	R&D Systems	Alexa Fluor® 488	FAB7227G
mAb de conejo Phospho-SMAD2 (Ser465/Ser467)	E8F3R	CST	Conjugado Alexa Fluor® 647	68550S
mAb de conejo SMAD2 XP®	D43B4	CST	Conjugado Alexa Fluor® 647	67617S
Kit de tinción celular LIVE/DEAD™ Fixable Yellow, para excitación 405 nm	n/c	Invitrogen	Amarillo (violet610)	L34959

Péptido	**Secuencia de péptidos**	**Peso bruto**	**Pureza**	**Proveedor**	**Número de catalogo**
MAGE-A1	EADPTGHSY	2,0 mg	91,5 %	GenScript	U1678DPBG0-1/PE1542

Medio	**Proveedor**	**Número de catalogo**
XVIVO 15	Lonza	04-418Q
DMEM +D-Glucosa +L-Glutamina	ATCC	11965-092

RPMI1640	ATCC	30-2001
Suero humano (inactivado por calor)	MP CELLect 100ml	2930949
Suero humano (inactivado por calor)	GeminiBio	100-512
Penicilina-Estreptomicina	Thermofisher Scientific	15149-122
Glutamax 100x	Thermofisher Scientific	35050-061
FBS, inactivado por calor	Thermofisher Scientific	A3840001

Reactivo	**Proveedor**	**Número de catalogo**
Factor de crecimiento de transformación humano β1 (hTGF-β1) (25 ug)	RD Systems	7754-BH-025/CF
Amortiguador de reconstitución 3 (HCl)	R&D Systems	RB03
Amortiguado I BD Phosflow Fix	BD	557870
Metanol (99,8 %) (125 mL)	CST	13604S
Amortiguador de dilución de anticuerpos para citometría de flujo (125 mL)	CST	13616S
DMSO	Sigma Life Science	D2650-100ML
DPBS/Modificado	Gibco	14190-144
Solución de tinción ViaStain AOPI	Nexcelom Bioscience	CS2-0106-25mL
Etanol desnaturalizado al 70 %	Decon Laboratories inc	8601
Solución de poli-L-ornitina, 0,01 %	Millipore-Sigma	P4957
IL2 humana recombinante	Sigma-Aldrich	11147528001
IL7 humana recombinante	RD Systems	207-IL/CF
Amortiguador de reconstitución 2 (BSA al 0,1 % en PBS)	RD Systems	RB02
Amortiguador EasySepTM	Stem Cell Technologies	20144
Kit de proliferación CellTraceTM Violet	Thermofisher Scientific	C34557

La adquisición de datos se realizó en un instrumento Cytoflex S. La compensación se realizó automáticamente con el software CytExpert. El análisis de los datos se realizó con FlowJo v7.6.5. Las estadísticas se exportaron en Excel 2010 y se analizaron.

La siguiente descripción detalla la estrategia de separación/acotación celular. Brevemente, las

células se separaron a partir del gráfico de puntos de FSC versus SSC y los singuletes se distinguieron de los agregados usando un gráfico de Área-FSC versus Altura-FSC. Las células viables se identificaron usando el gráfico de Live-Dead Infrarrojo cercano versus Área-FSC. Se separaron subpoblaciones de células viables y luego se evaluaron, incluyendo, $CD4^+$ (Células T auxiliares), $CD4^+/CD8^+$ (Células T auxiliares modificadas), $CD4^-/CD8^+$ (Células T citotóxicas) y $TGF\beta RII^+/CD34^+$ (células T-TCR modificadas que expresan DN-TGFβRII). Las células identificadas como $CD34^-$ o $CD34^+$ fueron evaluadas adicionalmente con respecto a la expresión de TGFβRII. Se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) para $CD34^-$/TFGβRII y $CD34^+$/TFGβRII.

El análisis mediante citometría de flujo confirmó que las células T-TCR TSC-204-A0101 de tres lotes diferentes contenían células auxiliares modificadas ($CD4^+$, ahora $CD4^+/CD8^+$), células T auxiliares no modificadas residuales ($CD4^+/CD8^-$) y células T citotóxicas ($CD8^+$). El porcentaje de células T auxiliares $CD4^+/CD8^-$ no modificadas se encontró dentro del rango entre 5,71 % y 7,08 %. Las células T auxiliares modificadas expresaban el correceptor CD8αβ exógeno y se caracterizaron como $CD4^+/CD8^+$. Los lotes de material de células T-TCR TSC-204-A0101 presentó entre 28,15 % y 31,35 % de estas células T auxiliares modificadas y el porcentaje de células T citotóxicas ($CD4^-/CD8^+$) se encontró dentro del rango entre 60,50 % y 65,60 %.

Se confirmó que las células T modificadas expresaban el TCR recombinante específico para el péptido EADPTGHSYderivado de MAGEA-1 unido a HLA-A*01:01, como lo reveló la unión de dextrámeros, así como el epítopo CD34. No se detectó ninguna población positiva para el dextrámero o positiva para CD34 entre las células T no transfectadas (UTF) de donantes compatibles, que ilustra la naturaleza altamente específica de la tinción. Para los tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 evaluados, el porcentaje de la población $Dextrámero^+/CD34^+$ variaba en un rango entre 50,70 % y 59,80 %.

Las células T $CD4^-$ y $CD4^+$ modificadas se pudieron unir al dextrámero, lo que confirma la presencia de TCR funcionales sobre la superficie de las células T auxiliares y citotóxicas. El porcentaje de poblaciones $Dextrámero^+/CD4^-$ variaba en un rango entre 43,90 % y 52,80 %, y el porcentaje de $Dextramer^+/CD4^+$ se encontró dentro del rango entre 9,43 % y 9,77 %.

Las células T modificadas que conforman en material TSC-204-A0101 también expresaban el DN-TGFβRII, como lo demuestra el marcado aumento de la señal $TGF\beta RII^+$ en la población

$CD34^+$ en comparación con las células $CD34^-$ no modificadas.

b. Función dependiente de la dosis de pMHC del TCR recombinante expresado por las células T-TCR TSC-204-A0101

La Figura 9 muestra la reactividad de las células T-TCR TSC-204-A0101 de tres donantes independientes frente a su péptido cognato/MHC según se determinó usando un ensayo de pulso peptídico. Las células objetivo NCI-H1395 transducidas con NucLight™ rojo con una titulación del péptido MAGE-A1 EADPTGHSY y se cocultivaron con células T-TCR TSC-204-A0101. Se evaluó la reactividad de TCR mediante la medición del crecimiento pérdida de las células NCI-H1395 objetivo en un ensayo de citotoxicidad a base de Incucyte®.

Para permitir el rastreo de las células objetivo en el ensayo de citotoxicidad a base de Incucyte®, las células NCI-H1395 fueron modificadas para expresar la proteína fluorescente NucLight™ rojo (NucLight™ rojo, Essen Bioscience) seguido de las instrucciones del fabricante. Las células NCI-H1395 fueron colocadas en placas un día antes de iniciar el cocultivo en 100 µL de RPMI FBS al 10 % PS al 1 % (Tabla 8) en placas de fondo plano de 96 pocillos y se dejaron recuperar durante 20-24 horas a 37 ºC, CO2 al 5 %. Las células NCI-H1395 fueron cultivadas a 1E4 células por pocillo para obtener una densidad celular objetivo de ~1E4 células por pocillo en el día del inicio del cocultivo. La densidad de cultivo se adaptó de acuerdo con la velocidad de crecimiento de la línea celular NCI-H1395. Los artículos de prueba representativos del proceso y sus controles UTF compatibles con el donante se descongelaron y se dejaron descansar durante la noche como se describe anteriormente.

En el día del cocultivo, las células objetivo NCI-H1395 se pulsaron con una titulación del péptido derivado de MAGE-A1 EADPTGHSY. Las diluciones de péptidos se prepararon en el medio de cultivo de células NCI-H1395 y 100 µL de péptidos se le agregaron a los pocillos objetivo en triplicados para una concentración final que varía de 20.000 ng/mL a 0,01 ng/mL. La placa con células objetivo se incubaron en una incubadora humidificada a 37 ºC y CO2 al 5 % durante 2 horas. El péptido no unido se lavó tres veces con medio de cultivo celular objetivo retirando el medio con pipeta y agregando medio fresco dos veces. Luego de tres lavados, se agregaron 100 µL de medios celulares objetivo a los pocillos lavados con péptido.

Luego de recuperar durante la noche, 5E4 células T CD34+ vivos con TCR TSC-204-A0101 se le agregaron a las células NCI-H1395 pulsadas con péptidos en 100 µL de medio de células T libre de citocinas durante para E:T de 5:1. Las células T-TCR TSC-204-A0101 y

células T de control UTF con células NCI-H1395 no pulsadas (0,0 ng/mL), células T de control UTF cocultivados con células NCI-H1395 pulsadas la más alta concentración de péptido EADPTGHSY (es decir, 20.000 ng/mL) y células NCI-H1395 no pulsadas cultivadas solas (NCI-H1395 no pulsadas) se utilizaron como controles negativos. Para asegurar una cantidad igual de células T totales colocadas, la concentración de células T UTF vivos se ajustó a la concentración de células vivas totales para las células T-TCR TSC-204-A0101 compatibles con el donante. Las células objetivo y efectoras combinadas se dejaron sedimentar durante ~20 minutos en una incubadora humidificada a 37 ºC y CO2 al 5 %, antes del inicio de la adquisición. El crecimiento celular de células NCI-H1395 se evaluó mediante el sistema de análisis de células vivas Incucyte® S3 y se cuantificó en intervalos de 3 horas durante 4 días.

La avidez de TCR se evaluó mediante la medición de la pérdida o el crecimiento de células NCI-H1395 en función de la dosis del péptido pulsado en las células NCI-H1395. Los datos adquiridos con IncuCyte® se analizaron con el uso del software del sistema de análisis de células vivas IncuCyte® S3 GUI Versión 2021A (Sartorius, Goettingen, Alemania). Se creó una definición de análisis personalizado para cuantificar el área ocupada por objetos rojos (es decir, células NCI-H1395 positivas para NucLight™ rojo) en el tiempo. Se normalizaron los datos analizados hasta t=0 y se expresaron como el porcentaje del crecimiento celular objetivo. Los datos analizados y normalizados se exportaron y graficaron en Prims (GraphPad) (v9.2.0 para Windows). El área bajo la curva (AUC) del crecimiento celular NCI-H1395 para cada dosis de péptidos se calculó y se graficó en función de la dosis de péptidos y una curva de regresión no lineal (con el uso de la ecuación sigmoide, 4PL, X es concentración) se utilizó para calcular la IC_{50} de la inhibición del crecimiento de células NCI-H1395 positivas para NucLight™ rojo (designada como IC_{50} de citotoxicidad en la figura resultante).

La actividad citotóxica del células T-TCR TSC-204-A0101 contra las células NCI-H1395 pulsadas con péptido se midió durante el tiempo en un generador de imágenes IncuCyte® S3 mediante la cuantificación del crecimiento relativo de las células NCI-H1395 etiquetadas con NucLight™ rojo (Figura 9A). El área bajo la curva (AUC) normalizada para el crecimiento resultante de células NCI-H1395 durante 96 horas de cocultivo con células T-TCR en función de la concentración del péptido se graficó (Figura 9B) y se calculó la IC_{50} de crecimiento de células NCI-H1395 (Figura 9B).

Como se muestra en la Figura 9A, en comparación con células NCI-H1395 no pulsadas (0,0 ng/mL, líneas grises), en presencia del péptido MAGE-A1, todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativas del proceso reaccionaron con las NCI-H1395 pulsadas con péptidos en una forma dependiente de la dosis. La IC_{50} calculadas para tres lotes de células T con TCR TSC-204-A0101 varían de 180,8 ng/mL a 556,5 ng/mL (Figura 9B). En conjunto, estos datos confirman que las células T-TCR TSC-204-A0101 son específicos y reaccionan eficazmente al péptido EADPTGHSY derivado de MAGE-A1 presentado en las células NCI-H1395 que expresan HLA-A*01:01.

c. Las células T-TCR TSC-204-A0101 exhiben producción de citocinas y Granzima B dependiente del objetivo

La inducción dependiente del objetivo de secreción de Granzima B, así como también la secreción de citocinas proinflamatorias IFN-γ, IL-2 y TNF-α, se evaluó luego de ~24 horas de cocultivo de 3 lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 con un panel de líneas de células cancerosas que expresan, de forma endógena, MAGE-A1 y HLA-A*01:01 (Tabla 8) y células NCI-H1395, que son positivas para HLA-A*01:01, pero negativas para MAGE-A1. Las células T de control no transfectados (UTF) compatibles con el donante se incluyeron como controles negativos en el experimento. Se utilizó una condición “solo células T” donde se cultivaron células T-TCR TSC-204-A0101 o células T de control UTF en ausencia de cualquier célula objetivo para establecer los niveles de referencia de Granzima B, IFN-γ, IL-2 y TNF-α en el ensayo.

Específicamente, un día antes de configurar el ensayo de cocultivo, se colocaron en placas 5E4 células objetivo modificadas NucLight™ rojo en 100 µL de su medio respectivo en placas de fondo plano de 96 pocillos y se dejaron recuperar durante 20-24 horas a 37ºC, CO2 al 5 %. Las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso y sus controles UTF compatibles con el donante se descongelaron y se dejaron descansar durante la noche como se describe anteriormente. Para iniciar el cocultivo, se agregaron 5E4 células T $CD34^+$ con TCR TSC-204-A0101 vivos a las células objetivo en 100 µL de medio de células T libre de citocina. Se utilizaron controles UTF compatibles con el donante como control negativo. Para asegurar la cantidad igual de células T totales colocados en placas, la concentración de células T UTF compatibles con el donante se ajustaron a la concentración de células vivas totales para las células T-TCR TSC-204-A0101. Las células T efectores colocados en placas

en ausencia de cualquier célula objetivo (“solo células T”) y se prepararon pocillos solo con objetivo como controles adicionales, estos controles recibieron 100 µL adicionales de medio de células T libres de citocina o 100 µL de medio de células objetivo adecuado (Tabla 8), respectivamente. Luego de 20-24 horas de cocultivo a 37 ºC CO2 al 5 %, se recolectaron sobrenadantes y se almacenaron a -80 ºC. Posteriormente, se cuantificaron IFN-γ, TNF-α, IL-2 y Granzima B secretadas en el sobrenadante en Protein Simple ELLA (plataforma automatizada de ELISA) con el uso de cartuchos de ELLA 4 plex de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó un software Simplex Explorer para ejecutar las muestras en el ELLA. Se exportaron los datos sin procesar en un archivo excel y se calculó la concentración de citocinas y Granzima B multiplicando la concentración de citocinas indicada con el factor de dilución. Los datos se graficaron en Graphpad Prism (v9.20).

Cuando las células T no transfectados (UTF) que no tienen TCR terapéutico se cocultivaron con líneas celulares positivas y negativas para MAGE-A1, los niveles de secreción de IFN-γ, IL-2, TNF-α y Granzima B fueron similares a los observados para la condición “solo células T” UTF. Estos datos confirman la falta de activación de células T donantes en ausencia del TCR terapéutico.

Cuando se cocultivaron células T-TCR TSC-204-A0101 con la línea celular NCI-H1395 de control negativo, los niveles de secreción de IFN-γ, IL-2, TNF-α y Granzima B fueron similares a los niveles de referencia observados en la condición “solo células T”. Estos datos demuestran la falta de reactividad de células T-TCR TSC-204-A0101 a células objetivo positivas para HLA-A*01:01 en ausencia de la expresión de MAGE-A1.

Como se muestra en la Figura 10A-10H, luego del cocultivo de células T-TCR TSC-204-A0101 con NCI-H1703, A375 y A101D, que expresan tanto MAGE-A1 como HLA-A*01:01, se observó una secreción potente de IFN-γ, IL-2, TNF-α y Granzima B a partir de todos los tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 evaluados. Cuando se comparó con la condición “solo células T” TSC-204-A0101, en presencia de líneas celulares objetivo positivas para MAGE-A1 y positivas para HLA-A*01:01, las células T-TCR TSC-204-A0101 presentaron una inducción de ~95-1475 veces de IFN-γ, una inducción de ~57-1760 veces de IL-2, una inducción de ~62-691 veces de TNF-α y una inducción de ~11,42-91,19 veces de Granzima B. La inducción de citocinas proinflamatorias y de Granzima B fue la más alta para la línea celular A101D en comparación con las líneas celulares NCI-H1703 y A375 para todos los donantes evaluados.

En conjunto, estos datos demuestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 operan en una forma dependiente del objetivo, reaccionando a líneas celulares objetivo que expresan de forma endógena MAGE-A1 y HLA-A*01:01 lo que tiene como resultado la secreción de citocinas proinflamatorias y la secreción de Granzima B.

d. Las células T-TCR TSC-204-A0101 proliferaron en una forma dependiente del objetivo

La proliferación dependiente del objetivo de las células T modificados (tanto $CD4^+$ como $CD4^-$) también fue evaluada. Brevemente, se colocaron células objetivo en placas un día antes de comenzar el cocultivo en 100 µL de medio respectivo en placas de fondo plano de 96 pocillos y se dejaron recuperar durante 20-24 horas a 37ºC, CO_2 al 5 %. Las células objetivo se cultivaron en pocillos triples en 4 placas de 96 pocillos a 2,5E4 células por pocillo (A101D, A375 y NCI-H1703) o 5E4 células por pocillo (NCI-H1395) para obtener una densidad de células objetivo de ~5E4 células por pocillo en el día del inicio del cocultivo. Las densidades de cultivo se adaptaron de acuerdo con las tasas de crecimiento variables de líneas celulares.

Las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso y sus controles UTF compatibles con el donante se descongelaron y se dejaron recuperar durante la noche como se describe anteriormente. Para eliminar la proliferación de referencia inducida por las citocinas de células T IL-2 e IL-7, se lavaron los efectores una vez que el medio de células T libres de citocinas, se recultivaron en placas G-Rex de 6 pocillos en la concentración de 1E6-2E6 células vivas/mL en medio de células T libre de citocinas y se incubaron durante 20-24 horas adicionales. Antes de iniciar el cocultivo, las células T efectores se tiñeron con un tinte cell trace violet (CTV) lavando los efectores una vez con PBS, tiñiendo los efectores durante 7 minutos a temperatura ambiente con tinte CTV (reconstituido de acuerdo con las instrucciones del fabricante y diluido 1:2000 en PBS). Luego del lavado de los efectores dos veces con medio de células T libre de citocinas, los elementos de prueba se resuspendieron en medio de células T libre de citocinas a 5E5 células vivas/mL y se agregaron 5E4 células T etiquetados con CTV/100 µL a las células objetivo para obtener un ~E:T de 1:1 en pocillos triplicados. El objetivo y efectores fueron luego cocultivados durante ~4 días a 37 ºC a CO2 al 5 %. Para asegurar que cada pocillo contenía suficientes células T para evaluar la proliferación de células T, se prepararon 4 pocillos de 96 pocillos iguales para cada condición. Al final del cocultivo, las células T efectores de las 4 placas iguales se agruparon y se transfirieron a una placa de fondo en v y se tiñeron con los reactivos de tinción enumerados en la Tabla 8. Antes

de la adquisición, se diluyeron perlas de conteo Absolute CountBright (Thermofisher Scientific) 1:10 en un amortiguador Easysep y los efectores se resuspendieron en 100 µL de amortiguador con las perlas de conteo. La adquisición de datos se llevó a cabo en un Cytoflex S. Se llevó a cabo la compensación automáticamente con el software CytExpert. Los análisis de datos se llevaron a cabo con FlowJo v10.8.1, Excel 2010.

Lo siguiente proporciona la estrategia de selección de células utilizada. Brevemente, para células T-TCR TSC-204-A0101, se determinó la cantidad de células T totales proliferantes ($TCR\alpha\beta^+CD34^+$), células T auxiliares proliferantes ($TCR\alpha\beta^+CD34^+CD4^+CD8^+$) y células T citotóxicos proliferantes ($TCR\alpha\beta^+CD34^+CD4^-CD8^+$). Para las células T de control UTF compatibles con el donante, se determinó la cantidad de células T totales proliferantes (células T $TCR\alpha\beta^+$), células T auxiliares proliferantes ($TCR\alpha\beta^+CD4^+$) y células T auxiliares proliferantes ($TCR\alpha\beta^+CD8^+$). Los datos sin procesar se exportaron como archivos excel, y la cantidad de células proliferantes se normalizaron con respecto al conteo de perlas. Luego, los conteos celulares normalizados se graficaron en GraphPad Prism (v10).

Las Figuras 11A-11D muestran resultados de la evaluación de la inducción dependiente del objetivo de la proliferación. El panel de líneas celulares cancerosas utilizado para evaluar la inducción dependiente del objetivo de la secreción de citocina y granzima B también se utilizó para evaluar la inducción dependiente del objetivo de la proliferación de células T. Los tres lotes independientes de células T-TCR TSC-204-A0101 y células T de control UTF se etiquetaron con tinte CTV y se cultivaron solas, o se cocultivaron con células cancerosas durante ~4 días a una ~E:T de 1:1. Posteriormente, la proliferación se evaluó como se describió anteriormente.

Las células T-TCR TSC-204-A0101 mostraron un pico único para células T TCR^+CD34^+ modificados CTV^+, células T auxiliares ($TCR^+CD34^+CD8^+CD4^+$) y células T citotóxicos ($TCR^+CD34^+CD8^+CD4^-$) cuando se cultivaron en ausencia de cualquier célula objetivo (“solo células T”) que indica una falta de proliferación en ausencia del péptido-MHC afín (Figura 11A). De forma similar, se detectó un pico único cuando las células T-TCR TSC-204-A0101 se cocultivaron con la línea celular NCI-H1395 positiva para HLA-A*01:01, pero negativa para MAGE-A1. Las cantidades de células T-TCR divididas en respuesta a objetivos de NCI-H1395 continuaron siendo compatibles con la condición “solo células T” (Figura 11B). Esto confirma la falta de una respuesta proliferativa de las células T-TCR TSC-204-A0101 hacia las células

objetivo positivas para HLA-A*01:01 en ausencia de la expresión de MAGE-A1.

En contraste, el cocultivo de células T-TCR TSC-204-A0101 con tres líneas celulares objetivo que expresa MAGE-A1 y HLA-A*01:01 (es decir, NCI-H1703, A375 y A101D) indujo una respuesta proliferativa potente en todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 evaluados como se evidencia mediante múltiples picos de intensidad de fluorescencia reducida del tinte de proliferación CTV. Tanto las células T-TCR auxiliares y citotóxicos mostraron una respuesta proliferativa luego del cocultivo con las células objetivo positivas para MAGE-A1, positivas para HLA-A*01:01. Sin embargo, las células T citotóxicos exhibieron niveles más altos de proliferación en comparación con las células T auxiliares. Por consiguiente, las cantidades absolutas de células T-TCR citotóxicos de división fueron superiores a los observados para células T-TCR auxiliares (Figura 11B).

La respuesta proliferativa de células T-TCR TSC-204-A0101 (Figuras 11B-11D) fue la más potente cuando se cocultivó con A101D, seguido de A375 y la más débil cuando se cocultivó con NCI-H1703. Adicionalmente, se observó una diferencia en la respuesta proliferativa entre tres lotes de células T-TCR, donde el lote PD353 mostró una respuesta proliferativa más potente en comparación con PD354 y PD355 (Figuras 11B-11D).

Las respuestas proliferativas de células T-TCR TSC-204-A0101 correlacionados con los niveles de citocinas y Granzina B producidos luego del cocultivo con las líneas celulares objetivo A101D produjeron la respuesta más potente y los niveles más altos de secreción de citocinas y Granzima B (Figura 10). De manera similar, los cocultivos de células T-TCR TSC-204-A0101 con A375 y NCI-H1703 produjeron una respuesta proliferativa inferior concordante con los niveles inferiores de secreción de citocina y Granzima B.

Como control, también se evaluaron las respuestas proliferativas de células T de control UTF compatibles con el donante al mismo panel de líneas celulares objetivo (Tabla 8). Las células T de control UTF mostraron un pico único de CTV^{+} en poblaciones de células T $TCR^{+}CD34^{-}$, linfocito T citotóxico ($TCR^{+}CD34^{-}CD8^{+}CD4^{-}$) y linfocito T auxiliar ($TCR^{+}CD34^{-}CD8^{+}CD4^{+}$) cuando se cultivaron en ausencia (“solo linfocito T) o presencia de células objetivo lo que indica una falta de proliferación de células T donantes en ausencia del TCR terapéutico. Por consecuencia, la cantidad de células $TCR^{+}CD34^{-}$, $TCR^{+}CD34^{-}CD4^{+}$ y $TCR^{+}CD34^{-}CD8^{+}$ fueron similares o inferiores a aquellos observados para la condición “solo linfocito T”.

Además, estos datos muestran que las células T-TCR TSC-204-A0101 funcionan en una

forma dependiente del objetivo y montan una respuesta proliferativa cuando se los expone a células objetivo que expresan MAGE-A1 y HLA-A*01:01. Esta respuesta proliferativa de células T-TCR TSC-204-A0101 es altamente específica y dependiente del objetivo como ya que se observaron niveles de referencia de proliferación en respuesta a las células objetivo NCI-H1395 que expresan HLA-A*01:01 pero que no tienen expresión de MAGE-A1. De manera importante, tanto las células T auxiliares y citotóxicos que componen los elementos de prueba TSC-204- A0101 se unieron funcionalmente cuando se cocultivaron con líneas celulares objetivo positivas para HLA-A*01:01 y positivas para MAGE-A1.

e. Las células T-TCR TSC-204-A0101 exhiben una función citotóxica selectiva y potente

Para evaluar la actividad citotóxica dependiente del objetivo de células T con TSC-204-A0101, se utilizaron tres lotes independientes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso y células T de control UTF compatibles con el donante en un ensayo de citotoxicidad basado en IncuCyte®. Las células T efectores se diluyeron en serie y se cocultivaron con una cantidad fija de células objetivo para evaluar diferentes efectores con respecto a relaciones objetivo (E:T). Las células T de control no transfectados (UTF) de donantes compatibles fueron evaluados de forma similar como controles negativos. Las líneas celulares objetivo evaluadas que correspondieron con el panel también utilizados inducción de prueba de secreción de citocinas y proliferación y comprendieron líneas celulares positivas para MAGE-A1, positivas para HLA-A*01:01 (es decir, A375, NCI-H1703 y A101D), así como también línea celular objetivo negativa para MAGE-A1, positiva para HLA-A*01:01 (es decir, NCI-H1395). Las células objetivo fueron modificadas para expresar NucLight™ rojo, una proteína fluorescente para permitir el rastreo y la cuantificación del crecimiento celular en el tiempo en el generador de imágenes IncuCyte®.

Específicamente, para permitir el rastreo de las células objetivo en el ensayo de citotoxicidad a base de Incucyte®, las células objetivo fueron modificadas para expresar la proteína fluorescente NucLight™ rojo (NucLight™ rojo, Essen Bioscience) seguido de las instrucciones del fabricante. Para el ensayo de citotoxicidad basado en Incucyte®, se colocaron células objetivo en placas un día antes de comenzar el cocultivo en 100 µL de medio respectivo en placas de fondo plano de 96 pocillos y se dejaron recuperar durante 20-24 horas a 37ºC, CO_2 al 5 %. Las células objetivo se cultivaron 5E3 células por pocillo (A101D, A375 y NCI-H1703) o 1E4 células por pocillo (NCI-H1395) para obtener una densidad de células objetivo de ~1E4

células por pocillo en el día del inicio del cocultivo. Las densidades de cultivo se adaptaron de acuerdo con las tasas de crecimiento variables de líneas celulares. Los artículos de prueba representativos del proceso y sus controles UTF compatibles con el donante se descongelaron y se dejaron descansar durante la noche como se describe anteriormente.

Las diluciones en serie de los efectores, las células T-TCR TSC-204-A0101 y las células T UTF compatibles con el donante se prepararon en medio de células T libre de citocinas para obtener la concentración de placa, y 100 µL de células T efectores se agregaron a las células objetivo, lo que tuvo como resultado relaciones de efector con respecto a objetivo (E:T) que varían de 5:1 a 0,625:1. Para la condición solo células objetivo, se agregaron 100 µL de medio de células T libres de citocinas a las células objetivo. Las placas se sellaron con Breathable Plate Sealer para limitar la evaporación del medio y se dejaron sedimentar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Luego de 15 minutos adicionales de incubación a 37 ºC CO_2 al 5 %, se utilizó Kimwipe para limpiar la condensación del fondo de las placas. Posteriormente, las placas se colocaron en el instrumento de análisis Incucyte® Live-cell (Sartorius) y comenzó la adquisición. La adquisición de datos y análisis de imágenes se llevó a cabo en un equipamiento y software Sartorius Incucyte® como se describe anteriormente. Los datos sin procesar fueron exportados como una hoja de excel y el crecimiento celular objetivo normalizado con respecto al punto de tiempo 0 horas se graficó en Graphpad Prism (v9.5). El área bajo la curva (AUC) se calculó para las curvas de crecimiento obtenidas con células objetivo cocultivadas con células T-TCR TSC-204-A0101 y linfocitos de control UTF a una E:T de 2,5:1, y el AUC de células T-TCR TSC-204-A0101 se normalizó con respecto a las células T de control UTF compatibles con el donante correspondiente.

Las curvas de crecimiento representativas de las células objetivo cocultivadas durante 3 días con células T-TCR del lote PD355 y células de control UTF compatibles con el donante se muestran en la Figura 12A; el área bajo la curva (AUC) para las curvas de crecimiento obtenidas con células T-TCR TSC-204-A0101 de todos los tres lotes en una E:T de 2,5:1, normalizados con respecto a las células T de control UTF correspondientes se muestran en la Figura 12B.

Se observó algo de inhibición del crecimiento celular objetivo luego del cocultivo con células T de control UTF en comparación con la condición “solo objetivo” (Figura 12). Sin embargo, dado que no se observó inducción de secreción de citocina y Granzima B ni proliferación de

células T de control UTF luego del cocultivo con las células objetivo (Secciones c y d anteriormente), es posible que las células T de control UTF inhibieran el crecimiento celular objetivo al competir con las células objetivo por nutrientes. En general, estos datos indican una respuesta citotóxica de células T donantes en ausencia del TCR terapéutico.

De forma similar a las células T de control UTF, las células T-TCR TSC-204-A0101 no mostraron respuesta citotóxica dirigida hacia la línea celular positiva para HLA-A*01:01 y NCI-1395 negativa para MAGE-A1 (Figuras 12A y 12B) consistente con la falta de inducción de secreción de citocina y Granzima B y la falta de proliferación de células T-TCR (Secciones c y d anteriores). A E:T de 2,5:1 o menor, no se observaron virtualmente diferencias en el crecimiento de las células objetivo NCI-H1395 luego del cocultivo con las células T-TCR TSC-204-A0101 con respecto a las células T de control UTF (Figura 12B).

En contraste con las células T de control UTF, todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 exhibieron una respuesta citotóxica potente y selectiva, lo que conduce a la inhibición del crecimiento de líneas celulares A375, NCI-H1703 y A101D positivas para MAGE-A1 y positivas para HLA-A*01:01 (Figura 12A). La magnitud de la respuesta citotóxica selectiva varió en función de la célula objetivo y la E:T considerada. Todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 destruyeron eficazmente ≥90 % de las células cancerosas A101D a una E:T tan baja como 0,625:1 dentro de las primeras 48 horas de cocultivo. Por el contrario, se observó una población residual del 36-40 % de NCI-H1703 incluso en la relación E:T más alta de 5:1 (Figura 12A) a 72 horas luego del cocultivo para todos los lotes evaluados.

Tomados en conjunto, estos datos indican que las células T-TCR TSC-204-A0101 montan una respuesta citotóxica potente y selectiva hacia líneas celulares cancerosas positivas para MAGE-A1 y HLA-A*01:01 consistentes con la secreción de citocinas y Granzima B proinflamatorias y la proliferación de células T-TCR TSC-204-A0101 (Secciones c y d; Figura 10 y Figura 11).

f. Las células T-TCR TSC-204-A0101 exhiben resistencia a la señalización de TGFbeta

La Figura 13 muestra la capacidad de las células T-TCR TSC-204-A0101 de resistir la inhibición mediada por TGFβ de la función de células T. Específicamente, se implementó una medición a base de citometría de flujo de la estimulación de la fosforilación de SMAD2. La inducción de la fosforilación del factor de transcripción SMAD2 es parte de la cascada de transducción de la señal de TGFβ canónica (Vander *et al*. (2018) *Cell Signal*. 52:112-120); por

lo tanto, la cuantificación fosfo-SMAD2 puede usarse como una lectura de la señalización de TGFβ.

Se llevó a cabo un estudio comparativo para verificar que la inducción de fosfo-SMAD2 reducida luego de la estimulación con niveles fisiológicos de TGFβ se correlaciona con inhibición mediada por TGFβ reducida en ensayos funcionales a base de células. Por ejemplo, se mostró que la inducción de fosfo-SMAD2 en respuesta a la estimulación de TGFβ se vio fuertemente reducida en células T-TCR TSC-204-A0101 que expresan DN-TGFβRII en comparación con células T-TCR que no tienen DN-TGFβRII. Los niveles totales de SMAD2 fueron comparables entre células T-TCR sin importar la expresión de DN-TGFβRII que indican que la señal de pSMAD2 reducida no fue debido a niveles inferiores de la proteína SMAD2 en células que expresan DN-TGFβRII. Estos datos respaldan que la inducción de fosfo-SMAD2 mediada por TGFβ se correlaciona con la capacidad de TGFβ de suprimir la función de las células T y que el ensayo de fosfo-SMAD2 puede usarse para evaluar la resistencia de las células T-TCR a la señalización de TGFβ.

Siguiendo con estos estudios comparativos, se utilizó un análisis de citometría de flujo de la fosforilación de SMAD2 en presencia y ausencia de TGFβ para evaluar la capacidad de TSC-204-A0101 representativos del proceso para resistir la señalización de TGFβ. En este ensayo, se utilizaron las células de control UTF compatibles con el donante similares al proceso (para los lotes PD353 y PD354) y células T UTF no relacionados para el lote PD355—que no expresan DN-TGFβRII y pueden señalizar naturalmente mediante el TGFβRII endógeno—como controles.

Específicamente, se midió el SMAD2 total y la fosforilación de SMAD2 en células T expuestos o no a TGFβ-1 mediante citometría de flujo. Se llevó a cabo el fosfo-flujo en tres lotes de elementos de prueba de células T-TCR representativos del proceso para demostrar que las células T-TCR TSC-204-A0101, que expresan DN-TGFβRII, son resistentes al efecto inmunosupresor de los niveles fisiológicos de TGFβ-1. Se incluyeron células T no transfectados a escala de laboratorio similares al proceso, ya que estas muestras de prueba no tienen DN-TGFβRII y tienen vías mediadas por TGFβRII intactas. Se evaluó la resistencia a la señalización de TGFβ-1 mediante análisis de histograma por citometría de flujo de fosfo-SMAD2 en células T-TCR (positivas para CD34) en comparación con controles no transfectados (negativos para CD34).

Se evaluaron muestras de prueba representativas del proceso, PD353 y PD354, junto con controles UTF a escala de laboratorio similares al proceso compatibles con el donante. Los controles UTF representativos del proceso tuvieron una viabilidad pobre <20 % y, por lo tanto, no fueron usados en este estudio. Las células T del lote PD355 no tuvieron un control UTF similar al proceso, a escala de laboratorio, compatibles con el donante disponible. En su lugar, se incluyeron dos controles UTF similares al proceso a escala de laboratorio no compatibles con el donante, para controlar el efecto de la señalización de TGFβ-1 en muestras de prueba con un receptor TGFβRII endógeno (RF2959-UTF y D6466-UTF; se obtuvieron resultados similares con ambos UTF). Se descongelaron células T-TCR y muestras de prueba de control UTF como se describe anteriormente. Luego de la recuperación durante la noche, se recolectaron muestras de prueba y se lavaron mediante centrifugación con RPMI-1640 libre de suero, luego se resuspendió en RPMI-1640 libre de suero hasta la densidad celular deseada de 5E6 células viables/mL. Las muestras de prueba se transfirieron a la placa de ensayo de fondo en v de 96 pocillos, 5E5 células viables totales por pocillo y se colocaron en la incubadora a 37 ºC durante 1 hora para reducir los niveles basales de fosforilación.

Las muestras de prueba privadas de suero se dejaron sin tratar o fueron tratadas con TGFβ-1 (10ng/mL). Las células se tiñeron simultáneamente con CD34(QBEND10)-AF488 para distinguir células modificadas ($CD34^+$) de no modificadas en las células T-TCR, y con tinción de células muertas amarillo fijable LIVE/DEAD para distinguir las células vivas de las muertas durante el análisis. Se prepararon mezclas madre con los materiales críticos (ver Tabla 8) y FMO; también se prepararon mezclas madre de control de un solo color. Se colocaron las placas de ensayo en la incubadora de 37 ºC durante 1 hora.

Las muestras de prueba se tiñeron de forma acorde: (1) No tratadas/CD34/LIVE/DEAD; (2) Tratamiento con TGFβ-1/CD34/LIVE/DEAD; (3) No tratadas/CD34 solo; (4) Tratamiento con TGFβ-1/CD34 solo; (5) No tratadas/LIVE/DEAD solo; y (6) Tratamiento con TGFβ-1/LIVE/DEAD solo. Algo de señal de CD34 en el epítopo extracelular se perdió luego de la fijación/permeabilización. Como control para la pérdida de señal de CD34 en células permeabilizadas, se incluyeron pocillos de control que contienen células vivas teñidas solo para CD34 en la placa de ensayo. Estos pocillos tuvieron incubaciones a la misma temperatura y lavados que las muestras de prueba; sin embargo, se agregó PBS durante las etapas de fijación y permeabilización. Se agregó fijación a las muestras de prueba en la placa

de ensayo para mantener su estado de fosforilación. Luego de la incubación de 15 minutos a 37 ºC, las placas de ensayo se lavaron mediante centrifugación y las células se permeabilizaron luego durante 20 minutos en hielo para permitir la inmunotinción intracelular de fosfo-SMAD2 (Ser465/Ser467) mAb de conejo SMAD2 total. Las placas de ensayo se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos. Las placas de ensayo se lavaron mediante centrifugación dos veces. Los sobrenadantes celulares se resuspendieron en un amortiguador de dilución de anticuerpo y se prepararon para la adquisición. Muestras de prueba experimentales: células T-TCR no tratados y células T-TCR tratados con TGFβ-1(10ng/mL); Controles experimentales: controles UTF no tratados (TGFβRII endógeno) y UTF tratados con TGFβ-1 (10 ng/mL); Controles de activación: FMO-fosfo/SMAD2 Total (no tratado o tratado) y LIVE/DEAD solo; Control de tinción: Tinción de proteína SAMD2 total (no tratados y tratados, tinción con CD34 y LIVE/DEAD), células T-TCR vivos (sin fija/sin permeabilizar) con CD34 solo (no tratado), Tinción de CD34 solo (no tratado y tratado), Tinción de la proteína SMAD2 total solo (no tratado y tratado) y sin tinción (no tratado y tratado).

Se llevó a cabo la adquisición de datos en un CytoFLEX S. Se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo con FlowJo v10.8.1, se exportaron las estadísticas a Microsoft 365 Excel 2023 y se analizaron. Se evaluaron los niveles fosfo-SMAD2 mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) tratada con TGFβ-1 con respecto a la MFI no tratada. Las activaciones se dispusieron de acuerdo con el control FMO-fosfo-SMAD2. Una señal con respecto a ruido (S/N) mayor que 2 indica una señal de fosfo-SMAD2 verdadera; los niveles sobre el fondo (sin tratar).

Las células T-TCR modificados se activaron en función de su etiqueta CD34 (QBEND10) y las activaciones se dispusieron de acuerdo con el control FMO-CD34 (LIVE/DEAD solo). Las células de control no transfectadas (UTF) no tienen ninguna células positiva para CD34, por lo tanto, fueron activadas en poblaciones negativas para CD34.

En función del análisis de histograma por citometría de flujo, se informó el porcentaje de fosfo-SMAD2 en TGFβ-1 estimulado y no estimulado para células T-TCR (células positivas para CD34) y controles UTF (células negativas para CD34). Las muestras de prueba fueron analizadas adicionalmente mediante la medición de los niveles de SMAD2 totales. La medición de los controles de los niveles de proteína SMAD2 totales para los niveles de

SMAD2 presentes en las muestras, lo que respalda la precisión de cualquier aumento o disminución en la fosforilación de SMAD2.

Como se ilustró en la Figura 13, el análisis de histograma de SMAD2 total y fosfo-SMAD2 se llevó a cabo en células T-TCR TSC-204-A0101 (púrpura, activados en $CD34^+$) no tratados (histogramas completos) y tratados con TGFβ-1 (histogramas abiertos) y sus controles UTF compatibles con el donante (negro, activados en $CD34^-$). En la fila inferior, la intensidad de fluorescencia media (MFI) de SMAD2 total fue similar para todas las cuatro condiciones de muestras de prueba. La relación de SMAD2 total en células T no tratados con respecto a tratados con TGFβ-1 permaneció debajo 1,10. Esto indicó que los niveles de proteína SMAD2 total fueron comparables a través de cada condición. Por consiguiente, cuando se mide la fosforilación de SMAD2, cualquier diferencia en la señal fue atribuida a una diferencia del estado de fosforilación de la proteína en lugar de a una diferencia en la cantidad de proteína SMAD2 total en las células.

Cuando se considera fosfo-SMAD2, no se detectó una señal en los elementos de prueba no tratados (histogramas llenos grises y púrpuras). Luego de la estimulación con TGFβ-1, fosfo-SMAD2 se detectó en el 91,50 %, 94,77 % y 92,43 % de las células T de control de UTF (histogramas abiertos grises en la Figura 13).

Estos datos confirmaron que el TGFβ-1 estimuló eficazmente las células T, ya que virtualmente toda la proteína SMAD2 fue fosforilada en células T de control que no tienen DN-TGFβRII. Comparativamente, la estimulación con TGFβ-1 de fosfo-SMAD2 en la fracción $CD34^+$ de 3 lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativa del proceso (que expresan DN-TGFβRII) se redujo con el 35,67 %, 17,20 % y 25,27 % de células positivas para fosfo-SMAD2 para los lotes PD353, PD354 y PD355 (histogramas abiertos púrpura), respectivamente (lo que representa una disminución de la señal positiva en un 61,02 %, 81,85 % y 72,66 %, respectivamente, cuando se lo compara con las condiciones de control UTF. Además de la disminución aguda en la proporción de células que muestran la proteína SMAD2 fosforilada, la intensidad de la señal en la fracción positiva para fosfo-SMAD2 también fue consistentemente reducida cuando se la compara con células T-TCR que expresan DN-TGFβRII y las células T de control UTF. Cabe destacar que la mayoría de las células T-TCR que expresan DN-TGFβRII fallaron esencialmente en la fosforilación de SMAD2 en respuesta a TGFβ-1 como reveló un picó de células con la señal fosfo-SMA2 alineada con la señal

medida en células no estimuladas.

En general, estas observaciones respaldan la conclusión de que las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso presentan una sensibilidad reducida a la señalización de TGFβ cuando se los compara con células que no tienen DN-TGFβRII.

Ejemplo 9: Eficacia *in vivo* de TSC-204-A0101

Se evaluaron la actividad antitumoral y tolerabilidad *in vivo* de una cantidad representativa de lotes derivados de donantes independientes de células T-TCR TSC-204-A0101 preparados como se describen en el Ejemplo 8 anterior y administrados de forma intravenosa en un modelo de cáncer representativo (modelo de xenoinjerto del tumor NCI-H1703 en ratones NCG hembra). Las células T-TCR TSC-204-A0101 exhibieron una fuerte y potente actividad antitumoral con dos de los tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 evaluados comparados con el vehículo y los grupos de control UTF respectivos en función de los datos del área bajo la curva (AUC) correspondientes a las curvas de crecimiento tumoral para ratones individuales en el estudio (ver Figura 15) y los datos de inhibición del crecimiento tumoral (TGI). El tercer lote de linfocitos con TCR TSC-204-0101 demostraron una actividad antitumoral modesta, que no alcanzó una significancia estadística. En función de la pérdida de peso corporal y observaciones clínicas, se descubrió que todos los grupos de tratamiento fueron satisfactoriamente tolerados. No se observaron signos obvios de toxicidad y no existieron fallecimientos relacionados con el tratamiento aparentes.

En particular, se comparó la eficacia de los tres lotes de TSC-204-A0101 de diferentes donantes con células T de control no modificadas (no transfectadas [UTF]) de donantes compatibles y tratamientos con vehículo (PBS) contra la línea de células tumorales NCI-H1703 implantada en ratones NCG hembra. La línea celular NCI-H1703 es una línea celular de cáncer pulmonar no microcítico. Estas células tumorales expresan de manera endógena MAGE-A1 y HLA-A*01:01 y se confirmó in vitro que eran reconocidas eficazmente por las células T-TCR TSC-204-A0101 (véase el Ejemplo 8 anterior). Se inocularon células tumorales por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales. Una vez que el injerto del tumor tuvo éxito (los tumores alcanzaron 100 mm^3 en promedio), los animales se asignaron al azar a siete diferentes grupos de tratamiento y recibieron dos dosis intravenosas (i.v.), con 7 días de diferencia, de TSC-204-A0101, de células T UTF de control, o de vehículo (PBS). Se recopilaron diferentes lecturas durante el transcurso del tiempo: (1) se evaluó la eficacia

antitumoral mediante mediciones quincenales del volumen del tumor; (2) se registraron mediciones de peso corporal quincenales junto con todas las observaciones clínicas para evaluar cualquier toxicidad relacionada con la inyección de TSC-204-A0101.

En la presente se describen los materiales y métodos que se utilizaron para las pruebas de eficacia in vivo. En resumen, se adquirió de ATCC (n.º de catálogo CRL-5889) la línea celular NCI-H1703 derivada de un cáncer de pulmón no microcítico y se cultivó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El medio de cultivo celular utilizado para cultivar esta línea celular fue RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS (Gibco). Las células tumorales se mantuvieron en fase logarítmica de crecimiento en matraces de cultivo de tejidos en una incubadora humidificada a 37 ºC, en una atmósfera de 5 % de CO2 y 95 % de aire.

En los días de la dosificación, se descongelaron criobolsas (75 ml) de células T-TCR TSC-204-A0101 criopreservadas y células T UTF de control provenientes de donantes compatibles (un grupo a la vez) usando un baño de agua a 37° C y las células T se transfirieron a un medio de descongelación que consistía en medio X-VIVO™ 15 (Lonza Cat# 04-418Q) y suero humano inactivado por calor al 5 % (Sigma Cat No. H3667). Luego, las células T se lavaron y se resuspendieron en un volumen adecuado de PBS estéril para para obtener suspensiones de dosificación a concentraciones de 2E7 células $CD34^+$ viables por cada 0,1 ml. La cantidad total de células T vivas inyectadas se ajustó de manera de tener en cuenta la pureza de $CD34^+$. La cantidad de células T de control UTF inyectada se ajustó para coincidir con la cantidad total de células vivas necesarias para TSC-204-A0101 del lote coincidente.

Se ordenaron cien ratones CR (100 hembras) NOD-*Prkdc*^{em26Cd52}*Il2r*^{gem26Cd22}/NjuCrl (NCG) y se les inocularon células tumorales NCI-H1703 para su posible asignación al estudio. Los ratones tenían 7 semanas de edad y pesaban entre 19,6 y 30,16 g al comienzo del estudio. Los grupos de tratamiento se crearon para evaluar 3 lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 de acuerdo con el diseño del estudio (Tabla 9). Los animales adicionales que tienen xenoinjertos de NCI-H1703 fueron sometidos a eutanasia.

Las células tumorales NCI-H1703 utilizadas para xenoinjertos subcutáneos se recolectaron durante el crecimiento de fase logarítmica y se lavaron con PBS. Los ratones se inocularon de forma subcutánea con 100 µL de una mezcla de matrigel al 50 %/medio al 50 % que contiene 2E6 células vivas de NCI-H1703 para establecer los tumores. Los tumores se midieron mediante calibrador bisemanalmente, comenzando 5 días luego de la inoculación y

continuando hasta el final del estudio (53 días luego de la inoculación, es decir, día de estudio 40). Las mediciones de los tumores se registraron en el software Overwatch. La aleatorización se llevó a cabo uno vez que el volumen tumoral promedio para todos los grupos alcanzó ~100 mm^3 (con 70,81 mm^3 a 131,88 mm^3 individual). La aleatorización corresponde al día 0 del estudio.

Los animales recibieron dosis repetidas de TSC-204-A0101 en el Día 1 y el Día 8 de acuerdo con el diseño del estudio presentado en la Tabla 9 y la Figura 14. El volumen de dosificación fue de 100 µL, administrado de forma intravenosa (*i.v.*). El Grupo 1 recibió inyecciones de control de vehículo (PBS); el Grupo 3 recibieron inyecciones de TSC-204-A0101 del lote PD353 (2,0E7 células vivas $CD34^+$ correspondientes a 2,38 E7 células vivas totales); el Grupo 5 recibió inyecciones de TSC-204-A0101 del lote PD354 (2,0E7 células vivas $CD34^+$ correspondientes a 2,56E7 células vivas totales); y el Grupo 7 recibió inyecciones de TSC-204-A0101 del lote PD355 (2,0E7 células vivas $CD34^+$ correspondientes a 2,63E7 células vivas totales). La cantidad de células T de control UTF inyectada para cada grupo coincidió con las células T vivos totales inyectados para los grupos de tratamiento con TSC-204-A0101 respectivos. El Grupo 2, el Grupo 4 y el Grupo 6 recibieron células T de control no transfectados (UTF) vivos del lote PD353 (2,38E7 células T vivas), PD354 (2,56E7 células T vivas), respectivamente.

Tabla 9: Diseño experimental y reactivos.

Diseño experimental

GR.	**N**	**Agente**	**Dosis de formulación (CD34+ vivos)**	**Vía**	**Calendario**
1	12	Vehículo (PBS)	NC	i.v.	Días 1,8
2	12	PD353-D (UTF)	2E7 células/animal	i.v.	Días 1,8
3	12	PD353-G (TSC-204-A0101)	2E7 células/animal	i.v.	Días 1,8
4	12	PD354-D (UTF)	2E7 células/animal	i.v.	Días 1,8

5	12	PD354-G (TSC-204-A0101)	2E7 células/animal	i.v.	Días 1,8
6	12	PD355-D (UTF)	2E7 células/animal	i.v.	Días 1,8
7	12	PD355-G (TSC-204-A0101)	2E7 células/animal	i.v.	Días 1,8

Reactivos

Medio	**Proveedor**	**Número de catalogo**
RPMI1640	ATCC	----
Suero bovino fetal (inactivado con calor)	Gibco	A38400
DPBS (solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco)	Gibco	14190-136
Quatricide al 0,4 %	Medline	N/A (de Explora)
Wescodyne	West Penetone	1511
DPBS	Gibco	14190-136
FBS	Gibco	35050-001
DMSO	Sigma	D265-100ml
GlutaMax (100x)	Gibco	35050-061
RPMI1640	ATCC	30-2001
Solución de tinción ViaStain AOPI	Nexcelom Bioscience	CS2-0106-25mL
Isopropanol al 70 %	Decon Laboratories Inc	8601
BD Cytofix	BD	554655

A lo largo del estudio, se observaron la salud general, la mortalidad y la morbilidad de los ratones dos veces al día, una vez por la mañana y otra por la tarde. Las observaciones junto a la jaula se realizaron diariamente. Los ratones no se retiraron de su jaula durante la observación, a no ser que fuese necesario para la identificación o confirmación de posibles

hallazgos. Los ratones también se observaron para detectar signos evidentes de cualquier efecto secundario adverso relacionado con el tratamiento (TR), peso corporal y medición del tumor. Se registraron los pesos corporales los días 0, 3, 6, 9, 12, 16, 19, 23, 26, 30, 33, 37 y 40 días del estudio. Se midieron los tumores mediante un calibre (unidades en mm^3) quincenalmente hasta el día 40 del estudio (Día 53 luego de la inoculación). El volumen tumoral y el peso corporal del ratón individual se registraron dos veces a la semana en el software Overwatch. Se determinaron el mayor diámetro longitudinal (longitud [L]) y el mayor diámetro transversal (ancho [W]) y se informaron en el software Overwatch. El volumen del tumor se estimó mediante la fórmula elipsoidal $V = (W^2 \times L)/2$.

El área debajo de la curva (AUC) es un método alternativo utilizado para representar la curva de crecimiento tumoral total para un ratón en un valor numérico integrado único, con el uso de Graphpad prism (Duan *et al*., (2012) *Journal of Immunological Methods* 382:224-228). Esto permite una comparación más sencilla entre diferentes grupos experimentales y proporciona una mejor idea sobre la actividad antitumoral de cualquier tratamiento, en estudios que implican grandes cantidades de ratones. El AUC se determinó para ratones individuales en este estudio, considerando sus curvas de crecimiento tumoral respectivas a partir del Día 0 al Día 40, ya que el 100 % de los animales estuvieron vivos en todos los grupos hasta el final del estudio.

Se calculó la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) mediante la comparación con el volumen tumoral promedio de animales en diferentes grupos en el final del estudio (si todos los ratones sobreviven hasta el final del estudio) o en un punto temporal más temprano cuando todos los ratones están vivos (si todos los ratones no sobreviven hasta el final del estudio). En el presente estudio el final del estudio fue el Día 40, y todos los ratones sobrevivieron hasta el Día 40 del estudio. Por lo tanto, se calculó el TGI tomando en cuente e volumen tumoral promedio de los ratones en diferentes grupos en el Día 40 del estudio. El TGI se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula.

TGI = 100 % x (volumen tumoral medio de control – volumen tumoral medio de tratamiento) / volumen tumoral medio de control.

El criterio de valoración del experimento fue la muerte o morbilidad debidas a la progresión del tumor, ulceración en el tumor, que el volumen del tumor alcanzara $2000mm^3$ o llegar al último día del estudio (día 40 luego del inicio de los tratamientos, correspondiente al día 64 luego de

la inoculación de células tumorales).

Los animales se monitorearon individualmente para detectar signos de morbilidad, disminuciones del peso corporal y progresión del tumor y se clasificaron como muertos en el estudio. El tiempo se registró en días hasta el punto final (TTE), para cada ratón que murió a causa de su enfermedad o se sacrificó debido a la progresión del tumor. A cualquier animal clasificado como muerto por causas relacionadas con el tratamiento (TR) se le asignó un valor de TTE igual al día de la muerte. Cualquier animal que no se vio moribundo pero que se sacrificó debido a la progresión de la enfermedad, de acuerdo con el respaldo de las observaciones de la necropsia, se registró como muerte no relacionada con el tratamiento debido a invasión o metástasis tumoral (NTRm) y se incluyó en el análisis de datos. Cualquier muerte por causas desconocidas (NTRu) o por accidente o error (NTRa) se excluyó de los cálculos de TTE y de todos los análisis posteriores.

Se llevaron a cabo las comparaciones en pares del área bajo la curva (AUC) y la inhibición del crecimiento tumoral (TGI), donde el AUC y el TGI medios para los animales de los grupos de control UTF fueron comparados con los del grupo de tratamiento con células T-TCR TSC-204-A0101 correspondientes, respectivamente. Se asumieron los estimados de AUC y la tasa de crecimiento como distribuidos normalmente, y se utilizó una prueba t no emparejada para evaluar si existe una diferencia significativa desde el punto de vista estadística entre los animales del grupo de control y del grupo tratado con células T-TCR TSC-204-A0101. Se llevaron a cabo análisis estadísticos con el uso de la prueba t de Student en el software GraphPad Prism® 10,0 y valores $P < 0,05$ se consideraron significativos desde el punto de vista estadísticos.

a. Las células T-TCR TSC-204-A0101 exhiben eficacia antitumoral *in vivo*

Se evaluó la eficacia de las células T-TCR TSC-204-A0101 frente al modelo de tumor NCI-H1703 en animales NCG hembra. Se compararon tres lotes de material TSC-204-A0101 representativo del proceso con células T no transfectadas (UTF) de control procedentes de donantes compatibles y con el tratamiento de control con vehículo (PBS). Los ratones se aleatorizaron en el Día 0 del estudio para producir 7 grupos de 12 ratones cada uno (ver Tabla 9), cuando el volumen tumoral promedio para todos los grupos experimentales fue de ~100 mm^3 donde los valores individuales varían de 70,81 mm^3 a 131,88 mm^3. Los ratones de los grupos experimentales individuales fueron dosificados con uno de los 3 lotes de células T-

TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso, o células T de control UTF respectivo o vehículo (PBS) dos veces, en un intervalo de una semana (Día 1 y Día 8 del estudio). Los grupos de tratamiento con TSC-204-A0101 se inyectaron con 2E7 células T-TCR $CD34^+$ vivos (es decir, modificados) en cada una de los dos momentos de dosificación. La dosis celular se ajustó para la pureza del material y correspondió a 2,38E7 células T totales para el lote PD353, 2,56E7 células T totales para los lotes PD354, y 2, 63E7 células T totales para el lote PD355, respectivamente. La cantidad de células T de control UTF inyectados para cada grupo de control UTF coincidió con las células T totales inyectados para los grupos de tratamiento con TSC-204-A0101 respectivos. La pureza de las células T-TCR modificados (el 76 %-84 % de $CD34^+$) y viabilidad (el 72 % - 75 %) de los tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 fueron, en general, comparables entre los grupos.

Como es evidente a partir de los perfiles de la curva de crecimiento tumoral para diferentes grupos experimentales en la Figura 15, los grupos que recibieron células T-TCR TSC-204-A0101 de los lotes PD353 e PD355 presentaron una actividad antitumoral significativa, en comparación con el grupo tratado con vehículo y con los grupos inyectados con control UTF correspondientes. Los animales de los grupos de control (Grupo 1 [Vehículo], Grupo 2, Grupo 4 y Grupo 6 [grupos de células T de control UTF de los lotes PD353, PD354 y PD355, respectivamente[) presentaron grandes tumorales con volúmenes tumorales promedio de 1154,23 mm^3, 713,1 mm^3, 1019,77 mm^3 y 780,79 mm^3, respectivamente, en el final del estudio. Sin embargo, el Grupo 3, Grupo 5 y el Grupo 7, que recibieron inyecciones *i.v.* de células T-TCR TSC-204-A0101, del lote PD353, PD354 y PD355, respectivamente, mostraron volúmenes tumorales promedio inferiores de 229,4 mm^3, 774,57 mm^3 y 422,89 mm^3, respectivamente, en el final del estudio. Estos resultados para los Grupos 3 y 8 fueron significativos desde el punto de vista estadístico y la eficacia antitumoral de las células T-TCR TSC-204-A0101 del lote PD354 también fueron observados a pesar de que 9 de 12 ratones (75 %) en el Grupo 5 (lote PD354 de TSC-204-A0101) presentaron volúmenes tumorales individuales < 1000 mm^3, que fueron inferiores que los volúmenes tumorales promedio del grupo de control UTF (Grupo 4; 1019,77 mm^3) y el grupo de vehículo de control (Grupo 1; 1154,23 mm^3) correspondientes en el final del estudio (Figura 15D).

El % de TGI fue calculado considerando el crecimiento tumoral en grupos de control (vehículo, y los grupos de control UTF correspondientes) y los tres lotes de grupos de tratamiento con

células T con TSC-204-A0101 en el Día 40 del estudio, ya que todos los ratones en el estudio estaban con vida. Cuando se compara con el grupo de control de vehículo (Grupo 1), se descubrió que el % de TGI es 80,12 % (valor p= 0,0029), y 63,36 % (valor p= 0,0195), para los grupos de tratamiento con células T-TCR TSC-204-A0101 de los lotes PD353 (Grupo 3), y PD355 (Grupo 7), respectivamente. De forma similar, cuando se compara con los grupos de control UTF correspondientes, el % de TGI es 67,83 % (valor p= 0,0064) y 45,83 % (valor p= 0,0463), para los grupos de tratamiento con células T-TCR TSC-204-A0101 de los lotes PD353 (Grupo 3), y PD355 (Grupo 7), respectivamente. No existió diferencia significativa entre la tasa de crecimiento de los tumores en los grupos tratados con control UTF (Grupo 2, Grupo 4 y Grupo 6) y el grupo tratado con el vehículo (Grupo 1).

Adicionalmente, los valores de AUC—que representan la curva del crecimiento tumoral total en el tiempo para un ratón en un valor numérico integrado simple—se calcularon para evaluar adicionalmente la actividad antitumoral en los grupos tratados con células T-TCR TSC-204-A0101 (ver Figura 15B). Los valores de AUC inferiores reflejan una carga tumoral inferior en ratones (Duan *et al*., (2012) *Journal of Immunological Methods* 382:224-228). De forma consistente con la observación anterior, se descubrió que los valores de AUC de los grupos tratados con células T-TCR TSC-204-A0101 de los lotes PD353 (Grupo 3), y PD355 (Grupo 7) fueron significativamente inferiores que los de los grupos de control UTF correspondientes (valores P 0,0008, y 0,0421, respectivamente) lo que indica adicionalmente la actividad antitumoral significativa de las células T-TCR TSC-204-A0101 contra NCI-H1703, *in vivo*.

b. Las células T-TCR TSC-204-A0101 exhiben un retraso *in vivo* de la mortalidad

No se observaron fallecimiento relacionados con el tratamiento aparentes. El peso corporal fue consistente entre los grupos a lo largo del estudio, sin importar el régimen de tratamiento, lo que no indica signos obvio de toxicidad en los grupos tratados (Figura 16).

Ejemplo 10: Perfil de alorreactividad para TSC-204-A0101

Se evaluó el perfil de alorreactividad del TCR recombinante utilizado para los linfocitos con T-TCR TSC-204-A0101. La alorreactividad es la capacidad de los TCR de reconocer las moléculas del MHC alogénicas que no fueron encontradas durante el desarrollo tímico y que se manifestarán potencialmente de forma clínica como una falla de fabricación debido a la reactividad al fratricidio, y la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) luego de la infusión en el paciente. Las células T-TCR TSC-204-A0101 no exhiben alorreactividad a

ninguno de los 110 alelos de MHC más comunes. Este resultado predice que el TSC-204-A0101 no presentará ninguna respuesta alorreactiva adversa en los pacientes.

En este estudio, las células T-TCR representativos desde el punto de vista mecánico (es decir, células T $CD3^+$ modificados mediante transducción de lentivirus para expresar el TCR terapéutico utilizado en TSC-204-A0101 junto con el correceptor CD8αβ) se cocultivaron durante 48 horas con células objetivo (células HEK293T) que expresan individualmente 110 de los MHC de clase I más comúnes (Maiers *et al*. (2007) *Erratum in: Hum Immunol*. 69:141) en un formato de matriz (observar la Tabla 10 para obtener una lista completa de MHC-I evaluados en este esetudio y su frecuencia en la población estadounidense). La reactividad del TCR terapéutico a moléculas de MHC alogénico y la citotoxicidad resultante en células objetivo se evaluaron mediante la medición de la inhibición del crecimiento de células objetivo causada por células T-TCR con respecto a células T $CD3^+$ de control de donante no transducidos (UTD).

Las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos desde el punto de vista mecánico provocaron una potente destrucción celular en células HEK293T que expresan HLA-A*01:01 y un fragmento de 90 aminoácidos que contiene un epítopo derivado de MAGE-A1 EADPTGHSY, que sirve como control positivo para el ensayo de destrucción. El cocultivo de T con TCR TSC-204-A0101 representativos desde el punto de vista mecánico con la matriz encontró que las células T-TCR no tuvieron una reactividad significativa a células HEK293T que expresan cualquiera de los 110 alelos HLA más frecuentes.

Tabla 10

Lista de los 110 MHC evaluados en este estudio

Alelos HLA-A	**frec.**	**Alelos HLA- B**	**frec.**	**Alelos HLA-C**	**frec.**
A*02:01:01:01	0,2375	B*07:02:01:01	0,1072	C*07:01:01:01	0,1410
A*01:01:01:01	0,1256	B*08:01:01:01	0,0902	C*07:02:01:01	0,1298
A*03:01:01:01	0,1149	B*44:02:01:01	0,0638	C*04:01:01:01	0,1275
A*24:02:01:01	0,0878	B*35:01:01:01	0,0587	C*06:02:01:01	0,0848
A*11:01:01:01	0,0551	B*44:03:01:01	0,0518	C*03:04:01:01	0,0752
A*23:01:01:01	0,0348	B*15:01:01:01	0,0486	C*05:01:01:01	0,0692
A*29:02:01:01	0,0330	B*51:01:01:01	0,0446	C*16:01:01:01	0,0466
A*68:01:01:01	0,0304	B*40:01:01	0,0432	C*02:02:01	0,0442
A*26:01:01:01	0,0273	B*18:01:01:01	0,0412	C*03:03:01:01	0,0435
A*32:01:01:01	0,0266	B*14:02:01:01	0,0293	C*12:03:01:01	0,0410

A*31:01:02:01	0,0260	B*57:01:01:01	0,0270	C*08:02:01:01	0,0382
A*30:01:01:01	0,0246	B*27:05:02:01	0,0240	C*01:02:01:01	0,0354
A*30:02:01:01	0,0209	B*53:01:01:01	0,0237	C*17:01:01:02	0,0204
A*68:02:01:01	0,0203	B*13:02:01:01	0,0209	C*15:02:01:01	0,0203
A*33:03:01:01	0,0162	B*38:01:01:01	0,0169	C*14:02:01:01	0,0142
A*25:01:01:01	0,0139	B*49:01:01:01	0,0169	C*12:02:01	0,0108
A*33:01:01:01	0,0129	B*40:02:01:01	0,0166	C*07:04:01:01	0,0104
A*02:06:01:01	0,0108	B*52:01:01:01	0,0150	C*08:01:01:01	0,0098
A*02:05:01:01	0,0107	B*58:01:01:01	0,0147	C*03:02:01	0,0077
A*74:01:01	0,0103	B*15:03:01:01	0,0139	C*18:01	0,0061
A*02:02:01:01	0,0088	B*35:03:01:01	0,0138	C*15:05:01:01	0,0061
A*34:02:01	0,0065	B*55:01:01:01	0,0132	C*16:02:01	0,0030
A*66:01:01:01	0,0050	B*45:01:01	0,0129	C*08:04:01	0,0023
A*36:01	0,0046	B*37:01:01:01	0,0109	C*03:05	0,0021
A*29:01:01:01	0,0029	B*42:01:01	0,0103	C*14:03	0,0015
A*02:07:01	0,0026	B*50:01:01:01	0,0093	**suma**	**0,9910**
A*03:02:01	0,0024	B*39:01:01:01	0,0089		
A*68:03:01	0,0024	B*35:02:01:01	0,0087		
A*02:03:01	0,0020	B*14:01:01:01	0,0083		
A*01:02	0,0016	B*58:02:01	0,0078		
suma	**0,9787**	B*57:03:01:01	0,0071		
		B*39:06:01	0,0068		
		B*15:10:01	0,0061		
		B*41:01:01:01	0,0053		
		B*48:01:01:01	0,0052		
		B*07:05:01:01	0,0046		
		B*56:01:01:01	0,0044		
		B*41:02:01:01	0,0043		
		B*39:05:01:01	0,0041		
		B*15:17:01:01	0,0040		
		B*35:08:01:01	0,0040		
		B*81:01:01	0,0038		
		B*15:16:01:01	0,0038		
		B*46:01:01	0,0037		
		B*35:12:01	0,0033		
		B*35:17:01	0,0028		
		B*40:06:01:01	0,0028		
		B*78:01:01:01	0,0025		
		B*15:02:01:01	0,0023		

		B*27:02:01:01	0,0023		
		B*38:02:01	0,0022		
		B*13:01:01:01	0,0021		
		B*47:01:01:02	0,0021		
		B*54:01:01	0,0020		
		B*15:18:01:01	0,0020		
		suma	**0,9660**		

Líneas celulares

Línea celular	Proveedor	Número de catalogo
HEK293T	ATCC	CRL-3216
Lenti-X	Takara Bio	632180

Medios y complementos

Medio	Proveedor	Número de catalogo
RPMI 1640	Gibco	A10491-01
DMEM	Gibco	11965
Complemento GlutaMAX	Gibco	35050061
OptiPRO SFM	Gibco	12309019
Penicilina estreptomicina:	Gibco	15149-122
Suero fetal bovino (FBS) inactivado con calor	Gibco	A3840102

Reactivos

Reactivo	Proveedor	Número de catalogo
IL-2 humana recombinante	PeproTech	AF-200-02
IL-7 humana recombinante	R&D Systems	207-IL-025
IL-15 humana recombinante	R&D Systems	247-ILB-005
Nourseotricina	GoldBio	N-500-1
Anticuerpo HLA A, B, C antihumano APC	BioLegend	311410
Anticuerpo CD3 monoclonal (OKT3)	eBioscience	16-0037-81

Activador de células T CD3/CD28/CD2 humanos ImmunoCult™	StemCell Technologies	10970
Reactivo de lentivirus NucLight rojo Incucyte®	Essen BioScience	4476
Reactivo de transfección Mirus *Trans*IT®-293	Mirus Bio	MIR2704
Alt-R® S.p. Nucleasa Cas9 V3 (n.º de lote 0000417827):	IDT	1081059
ARNtracr CRISPR-Cas9 Alt-R® (n.º de lote 0000415438)	IDT	1072534
Kit de microperlas CD3 StraightFrom® Leukopak®, humano	Miltenyi Biotec	130-122-365
Amortiguador de ejecución autoMACS® – Amortiguador de separación MACS®	Miltenyi Biotec	130-091-221
Amortiguador EasySep	StemCell Technologies	20144
CryoStor® CS10	StemCell Technologies	100-1061
Kit RT-qPCR de una etapa Luna® Universal	New England BioLabs	E3005X
Reactivo de transfección jetPRIME	Transfección polyplus	114-75
Kit L de 4D-Nucleofector™ X de la línea celular SE	Lonza	V4XC-1012
Kit de microperlas CD34, humano	Miltenyi Biotec	130-046-703

El lentiviral se empaquetó y se cuantificó la titulación del lentiviral. Se colocaron células Lenti-X (Takara Bio EUA, Mountain View, CA) en placas a un confluencia del 75 % y se transfectaron con el uso de un reactivo de transfección jetPRIME® (Polyplus, Illkirch, Francia). Brevemente, las construcciones lentivirales se mezclaron con plásmidos de empaquetamiento (pREV/pTAT/pVSVG/pGAGPOL) e incubados con un reactivo jetPRIME® de acuerdo con el protocolo del fabricante y se agregó un medio Opti-Pro™ SFM proinflamatorio a 24 horas luego de la transfección. Los sobrenadantes se recolectaron 48 horas luego de la transfección. Los sobrenadantes virales de TSC-201-A0101 se concentraron con el uso de

concentradores centrífugos Vivaspin 20 o casetes Vivaflow 50 (Sartorius, Bohemia, NY). La titulación del virus se determinó mediante RT-qPCR con el uso de un kit de RT-qPCR de una etapa Luna® Universal (New England BioLabs) en un QuantStudio ™ 7 Pro (ThermoFisher Scientific). Brevemente, el virus se diluyó en PBS, se lisó y se utilizaron 2 µl del virus lisado en RT-qPCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó la curva estándar con el uso diluciones en serie del virus con una titulación conocida. La titulación se expresó como TU/ml.

Para generar células T-TCR TSC-204-A0101 representativos de forma mecánica, se aislaron células T $CD3^+$ primarios de un donante saludable único con el uso del kit de microperlas StraightFrom® Leukopak® CD3 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células aisladas se congelaron en CryoStor® CS10 (Stem Cell Technologies) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. En el día -1, las células T $CD3^+$ se descongelaron, se lavaron con medio de células T completo (RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino [FBS] inactivado con calor al 10 %, penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 100 µg/mL, IL-2 humana recombinante [50 U/mL, PeproTech, Cranbury, NJ], IL-15 humana recombinante [5 ng/mL, R&D Systems], y IL-7 humana recombinante [5 ng/mL, R&D Systems]), cultivados a 1,0E6/mL, y se dejaron descansar durante la noche 37 ºC. En el día 0, las células T $CD3^+$ se lavaron y se resuspendieron en medio de células T fresco y se activaron con el uso del activador de células T CD3/CD28/CD2 humanos ImmunoCult™ (5 µL/1,0E6 células T CD3+, Stem Cell Technologies). En el día 1, las células se lavaron y se resuspendieron en un medio de células T completo fresco y se transdujeron con partículas lentivirales para expresar el TCR recombinante para TSC-204-A0101.

En el día 2, las células se lavaron y se resuspendieron en medio de células T completo fresco y se expandieron hasta el día 5 en placas de 6 pocillos G-Rex® (Wilson Wolf). En el día 5, las células se aislaron con el uso del kit de microperlas CD34 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células aisladas se resuspendieron en medio de células T completo fresco y se expandieron en 10 matraces G-Rex® (Wilson Wolf) hasta el día 12, momento en el cual las células se congelaron en CryoStor® CS10 y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Se generó una matriz que expresa MHC en 96 pocillos. Brevemente, se inactivaron HLA-A/B/C endógenos en células HEK293T con el uso de CRISPR. Los ARN guía se designaron

contra las secuencias conservadas a través de los loci de HLA-A, HLA-B y HLA-C con el uso de la herramienta multicrispr.net (Prykhozhij *et al*. (2015) Erratum in: PLoS One 10:e0138634). Se seleccionaron las siguientes guías: CRISPR-ALL-1: CGGCTACTACAACCAGAGCG, CRISPR-ALL-2: AGATCACACTGACCTGGCAG, CRISPR-ALL-3: AGGTCAGTGTGATCTCCGCA. Los ARNg se clonaron en el vector LentiCRISPR V2 con el uso de sitios BsmBI. Las células HEK293T se transfectaron con construcciones de plásmido guías con el uso de Mirus TransIT® (Mirus Bio, Madison, WI). Luego de 7 días las células MHC negativas se clasificaron con el uso del anticuerpo pan-MHC (BioLegend). Se expandieron células simples, y la ausencia de MHC se verificó mediante citometría de flujo y transferencia Western.

Las células HEK293T con MHC nulo se transdujeron con virus NucLight™ rojo IncuCyte® (Essen BioScience). Los pocillos transducidos se clasificaron para determinar la expresión NucLight™ rojo con el uso de un clasificador Sony SH800. Para generar una matriz de expresión de MHC, las células HEK 293T que expresan NucLight™ rojo con MHC nulo se transdujeron individualmente con los 110 MHC más comunes (pHAGE-EF1a-MHC-UBC-NAT) en pocillos individuales en placas de 96 pocillos. Las células transducidas se seleccionaron con nourseotricina (400 ng/ml, GoldBio) durante una semana. Las células que expresan los 110 alelos de MHC clase I más comunes se pasaron y almacenaron en placas de 96 pocillos como una matriz.

Para generar el control positivo para el ensayo, las células que expresan HLA-A*01:01 en la matriz anterior se transdujeron con un fragmento de 90 aminoácidos que contiene el epítopo MAGE-A1 (EADPTGHSY) y un casete de expresión AmCyan. Las células se clasificaron para la expresión de AmCyan con el uso de un clasificador de células espectral Invitrogen™ Bigfoot™ con Sasquatch Software (SQS). La expresión de alelos de MHC individuales en la matriz se verificó mediante la tinción con el uso de un anticuerpo clase I pan-MHC (BioLegend).

Luego, se preparó el cocultivo para el perfil de alorreactividad. Específicamente, en el día 0, las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos desde el punto de vista mecánico se reestimularon en matraces T25 rectos con 1E6 células T, 20E6 PBMC irradiadas, IL-2 humana recombinante [50 U/mL, Peprotech], y un anticuerpo monoclonal CD3 (OKT3) [0,1 µg/mL, eBioscience]. La mitad del volumen del medio se intercambió en los días 2, 4 y 5 con RPMI

1640 complementado con suero fetal bovino [FBS] inactivado con calor al 10 %, 100 IU/mL de penicilina, estreptomicina 100 µg/mL y IL-2 recombinante humana. En el día 5, las células objetivo en la matriz de 96 pocillos se pasaron y se cultivaron en placas de 384 pocillos. En el día 6, las células T se recolectaron y resuspendieron en un medio de citocinas que contiene IL-2 [100U/mL] para el cocultivo. El ensayo se realizó por triplicado. Las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos desde el punto de vista mecánico o células T de control no transducido se agregaron a una relación de efector:objetivo (E:T) de 5:1 y se incubaron con células objetivo durante 48 horas. Se midieron células objetivo en el tiempo con el uso de un IncuCyte® S3. La inhibición del crecimiento celular en el momento indicado de cocultivo en cada célula HEK293T que expresa MHC en el ensayo se calculó como 1-(célula doble[incubada con células T con TSC-204-A0101]/célula doble[incubada con células T de donante UTD]). Para corregir el efecto de lote de cada placa 384 pocillos, el valor de inhibición celular de cada pocillo (cada MHC) en cada placa de 384 pocillo se sustrajo en función de la mediana de inhibición celular de los pocillos en cada placa de 384 pocillos.

Como se muestra en la Figura 17, las células T-TCR TSC-204-A0101 representativos de forma mecánica lograron una inhibición de crecimiento celular completo (99,1 ± 0,003 %) en las células objetivo que expresan HLA-A*01:01 y el MAGE-A1 90mer que contiene el epítopo en el sitio luego de 48 horas de cocultivo. Esta condición sirve como un control positivo para el ensayo que confirma que las células T efectores fueron capaces funcionalmente de reaccionar a su péptido/MHC objetivo afín.

En ausencia de la expresión del epítopo de MAGE-A1, las células T-TCR TSC-204-A0101 no mostró inhibición celular significativa en células objetivo que expresa cualquiera de los 110 alelos de MHC clase I más comunes. Este resultado indica que el TCR terapéutico utilizado en las células T-TCR TSC-204-A0101 no presentan ninguna alorreactividad a los 110 alelos de MHC evaluados (Figura 17).

Ejemplo 11: Falta de reactividad fuera del tumor de las células T-TCR TSC-204-A0101

El riesgo de reactividad en la diana/fuera del tumor es bajo para las células T-TCR TSC-204-A0101, ya que MAGE-A1 es una proteína de cáncer/testículo que se produce durante el desarrollo embrionario, pero está prácticamente ausente en todos los tejidos adultos normales, excepto en los testículos. (Gjerstorff y col. (2007) Hum. Reprod. 22: 953-960), que son un tejido inmunológicamente privilegiado (Li y col. (2012) Front. Immunol. 3: !52 [Sic.];

Hedger (2014) Knobil Neill Physiol. Reprod. 2015: 805-892). Además, los estudios anteriores demuestran que la expresión de MAGE-A1 en tejido normal está restringida en gran medida a los testículos de acuerdo con la literatura anterior (van der Bruggen y col. (1991) *Science* 254*:* 1643-1647; Obenhaus y col. (2015) *Nat. Biotechnol.* 33*:* 402-407).Estos análisis de expresión génica indican que MAGE-A1 representa una diana segura para terapias basadas en células T con bajo riesgo de reactividad en la diana fuera del tumor.

La reactividad inespecífica de un TCR terapéutico puede surgir de la reactividad cruzada del TCR con un autopéptido/MHC. El análisis de seguridad de todo el genoma identificó 15 elementos fuera del objetivo de células T-TCR TSC-204-A0101: MAGE-A10, MAGE-A11, CCDC168, ZNF202, RPS6KA2, RPS6KA3, RPS6KA6, TECPR1, WDR45, STIL, SIRPB1, TENM1, ADAMTS20, CPO y SPATA22 (ver Ejemplo 5 anterior). De estos MAGE-A10, no se espera que MAGE-A11 y CCDC168 confieran riesgo de reactividad fuera del tumor o en el tumor adicional (ver Ejemplo 5 anterior). Como se describe más adelante, las células T-TCR TSC-204-A0101 no mostró consistentemente reactividad contra 6 líneas celulares cancerosas evaluadas que expresan de forma endógena elementos fuera del objetivo putativos. Además, las células T-TCR TSC-204-A0101 no mostraron reactividad a clones celulares simples HEK A*01:01 que sobreexpresan CPO. Además, no se observó una reactividad aparente del TCR terapéutico con una variedad amplia de células primarias evaluadas, que representan colectivamente sistemas relevantes desde el punto de vista fisiológico para la evaluación de la reactividad fuera del tumor de células T-TCR. Colectivamente, estos datos indican que ninguno de los elementos fuera del objetivo putativos identificados son elementos fuera del objetivo auténticos de TSC-204-A0101 y se espera que esa reactividad de los linfocitos con TCR TSC-204-A0101 sea restringida a las células cancerosas que expresan MAGE-A1 y HLA-A*01:01.

En general, se analizó la reactividad de las células T-TCR TSC-204-A0101 con un amplio panel de 62 células diana que comprendían 6 líneas de células cancerosas, 3 clones de HEK positivas para HLA A*01:01 modificadas para expresar, de forma estable, CPO, y 53 células primarias humanas sanas de múltiples tejidos y órganos (Tabla 11).

Tabla 11*:* Descripciones de células primarias y línea de células cancerosas diana

Descripciones de las líneas celulares cancerosas objetivo

Línea celular	**Proveedor**	**Número de**	**Medio de cultivo**

		catalogo	
MHH-ES-1	DSMZ	ACC 167	RPMI-1640 (ATCC 30-2001) + HIFBS al 10 % (Fisher Scientific A3840002) + 1X Pen/Estrep (Fisher Scientific 15149-122)
DMS 79	ATCC	CRL-2049	RPMI-1640 (ATCC 30-2001) + HIFBS al 10 % (Fisher Scientific A3840002) + 1X Pen/Estrep (Fisher Scientific 15149-122)
RPMI-7951	ATCC	HTB-66	EMEM (ATCC 30-2003) + HIFBS al 10 % (Fisher Scientific A3840002) + 1X Pen/Estrep (Fisher Scientific 15149-122)
NCI-H524	ATCC	CRL-5831	RPMI-1640 (ATCC 30-2001) + HIFBS al 10 % (Fisher Scientific A3840002) + 1X Pen/Estrep (Fisher Scientific 15149-122)
NCI-H1703	ATCC	CRL-5889	RPMI-1640 (ATCC 30-2001) + HIFBS al 10 % (Fisher Scientific A3840002) + 1X Pen/Estrep (Fisher Scientific 15149-122)
HEK-293 (modificadas en laboratorio para expresar HLA-A*01:01)	ATCC	CRL-1573	DMEM (Fisher Scientific 11965-092) + HIFBS al 10 % (Fisher Scientific A3840002) + 1X Pen/Estrep (Fisher Scientific 15149-122)

Descripciones de células primarias objetivo

Tipo de célula	**Número de tanda/lote**	**Número de catalogo**	**Proveedor**	**Medio (número de catalogo)**
PBMC (células	88900**0445**		Todas las células	X-VIVO15 (Lonza 04-418Q) + suero humano al 5 % (BIOIVTHUMANABSRMP-
	88860**7014**		DLS	

mononucleares de sangre periférica)	88901**2737**		Todas las células	1) + 1XGlutaMax (FisherScientific n.º 35050061) + 1X Penicilina/estreptomicina (Fisher Scientific 15149-122)
HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana)	486**Z026**	C-12200	Promocell	Medio de crecimiento de células endoteliales (C-22010)
	452**Z009**	C-12205		
NHDF (fibroblastos dérmicos humanos normales)	485**Z029**	C-12300	Promocell	Medio de crecimiento de fibroblastos (C-23010)
	482**Z012**.3	C-12302		Medio de crecimiento de fibroblastos 2 (C-23020)
	486**Z033**.2	C-12302		Medio de crecimiento de fibroblastos 2 (C-23020)
HPF (fibroblastos pulmonares humanos)	486**Z027**.1	C-12360	Promocell	Medio de crecimiento de fibroblastos 2 (C-23020)
	108**1503**,3	C-12360		
	446**Z031**	C-12360		
HCF (fibroblastos pulmonares cardiacos)	450**Z022**.1	C-12375	PromoCell	Medio de crecimiento de fibroblastos 3 (C-23025)
	470**Z011**.10	A-12992		
HAoSMC (células musculares lisas aórticas humanas)	**470Z**011.2	C-12533	PromoCell	Medio de crecimiento de células musculares lisas 2 (C-22062)
	36361	6110	ScienCell	Medio de células musculares lisas (SMCM, 1101)

HSAEpC (células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas humanas)	480**Z008**.2	C-12642	PromoCell	Medio de crecimiento de células endoteliales de las vías respiratorias pequeñas (C-21070)
HBSMC (células musculares lisas bronquiales humanas)	489**Z008**.10	C-12561	PromoCell	Medio de crecimiento de células musculares lisas 2 (C-22062)
	458**Z006**	C-12561		
NHEM (melanocitos epidérmicos humanos normales)	000047**4577**	CC- 2586	Lonza	Medio de crecimiento de melanocitos MGM™-4 BulletKit™ 4 (CC-3249)
	490**Z012**.2	C-12400	PromoCell	Medio de crecimiento de melanocitos (C-24010)
HCerEpC (células epiteliales del cuello del útero humano)	7002**9809**	PCS- 480-011	ATCC	Medio basal de células epiteliales del cuello del útero (PCS-480-032)
HCM (monocitos cardiacos humanos)	470**Z011**.9	C-12810	PromoCell	Medio de crecimiento de miocitos (C-22070)
	485**Z005**.2	C-12810		
HWP (preadipocitos blancos humanos-subcutáneos)	467**Z014**	C-12735	PromoCell	Medio de crecimiento de preadipocitos (C-27410) Medio de diferenciación de preadipocitos (C-27436) Medio de nutrición de adipocitos (C-27438)
	483**Z018**	C-12735		

Astrocitos	000067**2445**	CC-2565	Lonza	Medio de crecimiento de atrocitos AGM™ BulletKit™ (CC- 3186)
	36730	1800	Sciencell	Medio de astrocitos (AM, 1801)
Hepatocitos	**HH1153**	82006	DLS	UCRM (81015) y UPCM (81016)
	HH1158	82006		
	HH1160	82006		
HHSteC (Células estrelladas hepáticas)	300 **075- 8**	10HU-210	iXCells Biotech	Medio de crecimiento de células estrelladas (MD-0014)
Células musculares esqueléticas humanas (HSkMC)	**F1212**13W14	H-6167	Cell Biologics	Medio de células musculares lisas c/ Kit –500 ML (M2268)
	480Z012	C-12530	PromoCell	Medio de crecimiento de células musculares esqueléticas (C-23060)
	491Z012	C-12530	PromoCell	Medio de crecimiento de células musculares esqueléticas (C-23060)
RPEC (Células del epitelio pigmentario de la retina)	**29522**	6540	ScienCell	Medio de células epiteliales (EpiCM, 4101)
Células musculares lisas uterinas humanas (HUtSMC)	471**Z016**.2	C-12575	PromoCell	Medio de crecimiento de células musculares lisas 2 (C-22062)
	02614	FC-0075	LifeLine Cell Technology	Medio basal VascuLife® (LM-0002)

Neuronas humanas (HN)	**36723**	1520	ScienCell	Medio neuronal (NM, 1521)
Células endoteliales aórticas humanas (HAoEC)	451**Z003**.2	C-12271	PromoCell	Medio de crecimiento de células endoteliales MV (C-22020)
Células endoteliales de la arteria pulmonar humana (HPAEC)	489**Z008**.7	C-12241	PromoCell	Medio de crecimiento de células endoteliales (C-22010)
Monocitos (derivados de PBMC)	88900**0445**		Todas las células	Medio de macrófagos Immunocult-SF (StemCell Technologies #10961)
	88901**2737**		Todas las células	
Queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK)	488**Z006**.2	C-12001	PromoCell	Medio de crecimiento de queratinocitos 2 (C-20011)
Células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC)	447**Z026**.1	C-12221	PromoCell	Medio de crecimiento de células endoteliales MV (C-22020)
Células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HPMEC)	475**Z016**	C-12281	PromoCell	Medio de crecimiento de células endoteliales MV (C-22020)
	480**Z008**.1	C-12281		
	490**Z022**.1	C-12281		

Células endoteliales microvasculares cardiacas humanas (HCMEC)	451**Z015**.1	C-12285	PromoCell	Medio de crecimiento de células endoteliales MV (C-22020)
	480**Z013**	C-12285		
Células endoteliales microvasculares de ovario humanas (HOMEC)	**5719**	7300	ScienCell	Medio de células musculares endoteliales (ECM, 1001)
Células epiteliales corticales renales humanas (HRCEpC)	**19896**	4110	ScienCell	Medio de células epiteliales (EpiCM, 4101)
Células progenitoras CD34+ humanas (hCD34+-CB)	485**Z010**	C-12921	PromoCell	StemSpan SFEMII (StemCell Technologies 09655) + StemSpan™ CD34+ complementos de expansión (10X) (#02691)
	493**Z008**	C-12921		

El texto en negrita será utilizado para identificar el lote/tanda de células objetivo en las gráficas y los archivos de datos sin procesar. Las PBMC se aislaron a partir de Leukopaks competos adquiridos de proveedores indicados en la tabla.

Medios de células T

Medio	**Componentes**	**Solución madre (mL)**	**Número de catalogo**
	X-VIVO 15	1000	Lonza#04-418Q

“Medio de células T libre de citocinas”	Suero humano (inactivado por calor)	50	BIOIVT# HUMANABSRMP-1
	Pen-Estrep	10	Gibco#15149-122
	GlutaMAX (100x)	10	FisherScientific#35050061
“Medio de células T con citocinas”	Medio de células T libre de citocinas	500	NC
	IL-2 humana (5 µg/mL)	2,5	Sigma-Aldrich#11147528001
	IL-7 humana (10 µg/mL)	0,25	R&D Systems#207-IL-025

Medios y complementos

Medio	**Proveedor**	**Número de catalogo**
X-VIVO 15	Lonza	04-418Q
Suero humano (inactivado por calor)	Sigma-Aldrich	H3667-100
FBS, inactivado por calor	BIOIVT	HUMANABSR MP-1
GlutaMAX (100x)	Fisher Scientific	35050061
Penicilina- estreptomicina	Gibco	15140-122
Medio RPMI 1640	Gibco	A10491-01
Medio DMEM	Gibco	11965
Medio EMEM	ATCC	30-2003
Medio de crecimiento de células endoteliales 2	PromoCell	C-22011
Medio de crecimiento de células endoteliales	PromoCell	C-22010
Medio de crecimiento de células endoteliales MV	PromoCell	C-22020
Medio de crecimiento de fibroblastos	PromoCell	C-23010
Medio de crecimiento de fibroblastos 2	PromoCell	C-23020

Medio de crecimiento de fibroblastos 3	PromoCell	C-23025
Medio de crecimiento de células musculares lisas 2	PromoCell	C-22062
Medio de crecimiento de células endoteliales de las vías respiratorias pequeñas	PromoCell	C-21070
Medio de crecimiento de células endoteliales de las vías respiratorias	PromoCell	C-21060
Medio de células musculares lisas	ScienCell	1101
Medio de crecimiento de melanocitos	PromoCell	C-24010
Medio basal de células epiteliales del cuello del útero	ATCC	PCS-480-032
Medio de crecimiento de melanocitos MGM™-4 BulletKit™ 4	Lonza	CC-3249
Medio de crecimiento de miocitos	PromoCell	C-22070
Medio de crecimiento de preadipocitos	PromoCell	C-27410
Medio de diferenciación de preadipocitos	PromoCell	C-27436
Medio de nutrición de adipocitos	PromoCell	C-27438
Medio de crecimiento de atrocitos AGM™ BulletKit™	Lonza	CC-3186
Medio basal VascuLife®	Lifeline Cell Technology	LM-0002
Medio de recuperación de hepatocitos criopreservados universal (UCRM)	In Vitro ADMET Laboratories	81015
Medio para la colocación en placas de células primarias de hepatocitos universal (UPCM)	In Vitro ADMET Laboratories	81016
Medio de crecimiento de células estrelladas	iXCells Biotechnology	MD-0014
Medio de astrocitos	ScienCell	1800

Medio de células musculares lisas	Cell Biologics	M2268
Medio de células epiteliales	ScienCell	4101
StemSpan SFEM II	StemCell Technologies	09655
Medio de crecimiento de células musculares esqueléticas	PromoCell	C-23060
Medio de diferenciación muscular esquelético	PromoCell	C-23061
Medio de neuronas	ScienCell	1521
Medio de macrófagos Immunocult™-SF	StemCell Technologies	10961
Medio de crecimiento de queratinocitos 2	PromoCell	C-20011
Medio de células endoteliales	ScienCell	1001
StemSpan SFEMII	StemCell technologies	09655
Complemento de expansión CD34+ StemSpan (10X)	StemCell technologies	02691

Reactivos

Reactivo	**Proveedor**	**Número de catalogo**
DPBS sin CaCl2, MgCl2	Thermofisher Scientific	14190-144
TrypLE	Thermofisher Scientific	1260-08
Solución de tinción ViaStain AOPI	Nexcelom Bioscience	CS2-0106- 25mL
DMSO	Sigma Life Science	D2650-100mL
Interleucina 2, humana recombinante (rhIL-2)	Sigma-Aldrich	1147528001

Interleucina 7, humana recombinante (rhIL-7)	R&D Systems	207-IL-025
Cartucho Simple Plex para 72 muestras, IFNg humano de 1 analito (3.ª generación)	Biotechne, Protein Simple	SPCKB-CS-002697
Kit RNeasy Plus Mini	Qiagen	74124
Escalera Tapestation RNA ScreenTape	Agilent	5067-5578
Amortiguador de muestra para Tapestation RNA ScreenTape	Agilent	5067-5577
Qubit RNA BR	TermoFisher	Q10210
Kit de preparación de genoteca de ARN direccional NEBNext Ultra II para Illumina	NEB	E7760S
SPRIselect	Beckman Coulter	B23319
Qubit dsDNA HS	TermoFisher	Q32854
Reactivos D5000 de alta sensibilidad Tapestation	Agilent	5067-5593
Escalera D5000 de alta sensibilidad Tapestation	Agilent	5067-5594
PhiX Control v3	Illumina	FC-110-3001
Reactivos NextSeq 1000/2000 P1 (300 ciclos)	Illumina	20050264
Reactivos NextSeq 1000/2000 P2 (200 ciclos) v3	Illumina	20046812
Reactivos NextSeq 2000 P3 (300 ciclos)	Illumina	20040561

Como medida de la reactividad de las células T se determinaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo. Se realizó una secuenciación masiva de ARN en todas las células diana para determinar la expresión de doce posibles elementos fuera del objetivo putativos, de TCR TSC-204-A0101 identificados en el Ejemplo 5 anterior. Las células T-TCR representativas del proyecto que se produjeron a partir de tres donantes independientes se probaron sistemáticamente contra cada célula diana.

En la Figura 18 se describen los pasos y los cronogramas del ensayo de citoquinas que se utilizó para probar la reactividad fuera del tumor de células T-TCR TSC-204-A0101. En resumen, se cocultivaron durante entre 20-28 horas células T-TCR TSC-204-A0101 representativas del proceso y células T UTF de control compatibles con el donante de tres

donantes independientes (como se generaron en el Ejemplo 8 anterior) con líneas de células cancerosas HLA-A*01:01$^+$, células humanas primarias de donantes sanos. Se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se evaluaron los niveles de IFN-γ como medida de la reactividad de las células T frente a las células diana. Se comparó la reactividad de TSC--204-A0101 para las células diana primarias con múltiples controles positivos y negativos. Se utilizaron múltiples controles negativos para establecer los niveles iniciales de IFN-γ en el ensayo. Estos incluyeron (1) células T UTF compatibles con donantes cocultivadas con las mismas células diana, (2) células T-TCR TSC-204- A0101 y células T UTF cocultivadas con la línea celular de control negativo HEK A*01:01, (3) TSC-204-A0101 y células T UTF cultivadas solas en ausencia de dianas, y (4) células diana cultivadas solas en ausencia de células T. Se incluyeron controles positivos para garantizar que las células T-TCR TSC -204- A0101 y las células diana utilizadas en el ensayo fuesen funcionales. Las células diana pulsadas con el péptido EADPTGHSY derivado de MAGE-A1 se cocultivaron con células T-TCR TSC-204-A0101 para garantizar que las células diana estuviesen sanas y expresasen niveles suficientes del HLA para activar las células T-TCR en respuesta al péptido cognado/MHC (pMHC). Las células T-TCR TSC-204-A0101 se cocultivaron con la línea celular NCI-H1703 de control positivo para establecer los niveles de IFN-γ en respuesta a la expresión endógena de MAGE-A1 y HLA-A*01.01.

Se descongelaron las células diana y las células T-TCR. Las líneas de células cancerosas se descongelaron en un baño de agua a 37 ºC y se lavaron una vez con su respectivo medio de cultivo celular para eliminar los reactivos de criopreservación. Luego de eso, las células se resuspendieron en su respectivo medio de cultivo celular y se cultivaron de acuerdo con procedimientos estándar en matraces de 175 cm^2 (células diana adherentes) o placas G-REX® de 6 pocillos (células objetivo en suspensión) en incubadora humidificada a 37 ºC y 5 % CO_2. Las células se mantuvieron en un estado subconfluente, en la fase de crecimiento exponencial y se hicieron pasajes una o dos veces por semana según fuese necesario. Las líneas de células cancerosas se mantuvieron en cultivo durante por lo menos un pasaje y durante no más de 4 semanas antes del inicio del cocultivo con células T-TCR.

Se descongelaron las células humanas primarias y sembraron en los medios apropiados (Tabla 11) en matraces/placas de cultivo de tejidos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El día siguiente a la descongelación se reemplazó el medio de las células primarias

por un medio fresco apropiado. Luego de eso, los medios se reemplazaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante hasta que las células alcanzaron confluencia y estuvieron listas para el cocultivo con células T-TCR. Los preadipocitos blancos humanos (HWP) se diferenciaron en adipocitos durante dos semanas, las cuales luego se utilizaron como células diana en el cocultivo con células T-TCR. Los miocitos cardíacos humanos (HCM) se dejaron madurar en el cultivo durante 2 semanas antes de probarlos como dianas en el cocultivo. Inmediatamente después de la descongelación se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como dianas. Dos de tres lotes de células musculares esqueléticas humanas (HSkMC) se colocaron directamente en placas de 96 pocillos luego de descongelar y se diferenciaron para formar miotubos. Las neuronas humanas se colocaron directamente en placas de 96 pocillos luego de descongelar y se utilizaron para el cocultivo luego de una semana. Los hepatocitos se congelaron y se colocaron directamente en placas de fondo plano de 96 pocillos a la densidad recomendada por el proveedor. Los monocitos se aislaron en el momento de PBMC y se utilizaron como objetivos en el cocultivo.

Se descongelaron las células T-TCR, de manera que el día -1 las células T se descongelaron en un baño de agua a 37 ºC y se lavaron con medio para células T libre de citoquinas para eliminar los reactivos de criopreservación antes de resuspenderlas en medio para células T (Tabla 11) que contenía citoquinas. Se sembraron células T en placas de 6 pocillos G-REX® a una densidad de 1E6-2E6 células viables/ml y se dejaron recuperar en una incubadora humidificada a 37 ºC y 5 % de CO_2 durante ~20-28 horas.

Las líneas de células cancerosas adherentes diana se sembraron un día antes de establecer el cocultivo (*es decir, el día* -1). Las células se resuspendieron en los medios respectivos a una densidad de 0,5E6 células/ml. Las células diana se sembraron en placas de 100 µl de su medio respectivo (Tabla 11) en placas de fondo plano de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo y se dejaron unir durante toda la noche en la incubadora a 37 ºC.

Se recolectaron las células primarias de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las células se resuspendieron en los medios respectivos a una densidad de 0,5E6 células/ml. Las células diana se sembraron en 100 µl de su medio respectivo (Tabla 11) en placas de fondo plano de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo y se dejaron unir durante toda la noche en la incubadora a 37 ºC. Se descongelaron neuronas humanas y se colocaron directamente en placas de fondo plano de 96 pocillos a 45.000 células/pocillo. Los hepatocitos se

descongelaron y se sembraron directamente en placas de fondo plano de 96 pocillos a las densidades recomendadas por el proveedor el día -1. Del mismo modo, las HWP, HCM, y dos lotes de HSkMC se colocaron en placas directamente en las densidades de siembra recomendadas por los proveedores.

Las líneas de células cancerosas y las células primarias se recolectaron por separado en tubos (2E5-3E6 células cada uno) y, luego de un lavado con PBS, se congelaron instantáneamente como gránulos para la secuenciación de ARN para determinar la expresión de elementos fuera del objetivo del TCR terapéutico en células T-TCR TSC-204-A0101.

El cocultivo se estableció el día 0. Las células objetivo en suspensión se resuspendieron en medio respectivo a una densidad de 1E6 cells/mL. Las células objetivo se colocaron en 100 µL en su medio respectivo (Tabla 11) en placas de fondo plano de 96 pocillos a 100.000 células por pocillo. El péptido MAGE-A1 (EADPTGHSY) se diluyó hasta una concentración final de 200 ng/ml en un medio de células T libres de citocina. El día del cocultivo, la células de pocillos relevantes se pulsaron con péptidos con 100 µl de medio que contenía péptidos para obtener una concentración de péptidos de 100 ng/mL y se incubaron durante 2-3 horas a 37 ºC, 5 % de CO_2. Luego de la incubación, las células se lavaron suavemente 3 veces con medio de células T libres de citocina y se agregaron 100 µl de medio para células diana. Las placas se observaron bajo el microscopio para confirmar que las células permanecieron unidas a menos que se describa lo contrario. Las células objetivo en suspensión fueron pulsadas con péptidos en tubos a una concentración final de 100 ng/mL durante 2-3 horas, se lavaron dos veces con medio de células T libre de citocinas, se resuspendieron a una densidad de 1E6/mL y se colocaron en 100 µL de su medio respectivo (Tabla 11) en placas de fondo plano de 96 pocillos a 100.000 células por pocillo.

Se recolectaron células T-TCR TSC-204-A0101 y células T UTF compatibles con el donante luego de dejarlas recuperar durante toda la noche, se resuspendieron en medio para células T libre de citoquinas y se agregaron 100 µL de 80,000 linfocitos T-TCR $CD34^+/Q^+$ TSC-204-A0101 a los pocillos adecuados para el cocultivo con células diana. Los mismos números totales de células T de control UTF correspondientes se le agregaron para cualquier donante de células T dado. Para el control 'solo células T', se sembraron 100 µl de suspensión de células T-TCR junto con 100 µl de medio para células T sin citoquinas.

Para los pocillos "solo células diana", se agregaron 100 µl de medio para células T sin

citoquinas (Tabla 11) al medio para células diana. Los cocultivos se incubaron a 37 ºC y 5 % de CO_2 durante 20-28 horas.

La evaluación basada en Ella de la reactividad de TCR para su pMHC cognado se realizó del día 1 al 8. Se midió la secreción de IFN-γ para evaluar la reactividad de las células T-TCR y las células T UTF compatibles con el donante frente a líneas de células cancerosas y células primarias. Luego de 20-28 horas de cocultivo a 37 ºC y 5 % de CO_2, se recolectaron los sobrenadantes y se congelaron a -80 ºC. Luego de descongelar los sobrenadantes, se realizó el análisis de IFN-γ en Protein Simple ELLA (plataforma ELISA automatizada) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos sin procesar se exportaron y representaron gráficamente en GraphPad Prism (v9.4.1).

Se realizó una secuenciación masiva de ARN para determinar la expresión de posibles elementos fuera del objetivo de células T-TCR TSC-204-A0101. Se extrajo el ARN total de los sedimentos celulares utilizando los kits RNeasy® Plus Mini. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se aisló ARN poliadenilado de hasta 1 µg de ARN total utilizando el módulo de aislamiento magnético de ARNm NEBNext® Poly(A) y se construyeron bibliotecas direccionales de RNAseq utilizando el kit de preparación de biblioteca direccional de ARN NEBNext® Ultra II para Illumina (NEB, E7760S). Luego se secuenciaron las bibliotecas en pares (100 pb x 100 pb) en una máquina Illumina NextSeq®2000. Antes del cálculo de la alineación y la expresión genética se procesaron los archivos Fastq. Las herramientas que se utilizaron para el preprocesamiento fueron Trimmomatic para cortar el adaptador y las secuencias específicas de Illumina de la lectura. La alineación se realizó utilizando hisat2 y se anotó en la referencia GRCh38. La referencia GRCh38 fue tomada de Gencode, versión 30 (GRCh38.p12). Los archivos de alineación resultantes se ordenaron por coordenadas utilizando Samtools antes del cálculo de la expresión genética utilizando la función subReads featureCounts. Los recuentos de características se convirtieron a TPM (transcripciones por millón) dividiendo primero los recuentos de lecturas por la longitud de cada gen en kilobases para obtener lecturas por kilobase (RPK). Se suman las RPK por muestra y luego esto se divide por 1.000.000 para obtener un factor de escala "por millón" para generar las TPM finales para cada muestra. En la escala de color utilizada en los mapas de calor de RNAseq los valores de TPM cero se establecieron como color blanco y los valores superiores a cero siguen una escala de color continua hasta 100 TPM de acuerdo con la referencia que figura

junto a cada mapa de calor en las Figuras 19 y 21.

a. Expresión celular primaria y derivada de elementos fuera del objetivo putativos

Se realizó una secuenciación masiva de ARN en células diana para determinar la expresión de MAGEA1 y los elementos fuera del objetivo putativos identificados de TSC-204-A0101. Como se muestra en la Figura 19, se detectaron diversos niveles de expresión de ZNF202, RPS6KA2, RPS6KA3, RPS6KA6, TECPR1, WDR45, STIL, SIRPB1, TENM1, ADAMTS20 y SPATA22 en los tipos de células evaluados en este estudio.

Los datos de RNAseq internos mostraron que todas las células primarias evaluadas mostraron una expresión ubicua de ZNF202, RPS6KA2, RPS6KA3, RPS6KA6, TECPR1, WDR45, SIRPB1 y STIL a diversos niveles. De todas las células primarias evaluadas, se observó la expresión más alta de ZNF202 de 34,9 TPM en NHEK. Todos los otros tipos de célula primarias exhibieron una expresión de ZNF202 que varía de 1,5 a 12,4 TPM. Se observó la expresión más alta de RPS6KA2 en HPMECs a 354,7 TPM. La expresión de RPS6KA2 >100 TPM también se observó en HUVECs (105,5 TPM), NHEMs (288,1 TPM), adipocitos (116,7 TPM), HSkMCs (179,3 TPM), HAoEC (100,3 TPM), HCMEC (116,3 TPM), HCAEC (185,3 TPM) y HOMEC (130,3 TPM). Todas las otras células primarias evaluadas exhibieron una expresión de 1,6 TPM a 98,4 TPM de RPS6KA2. Las HCAEC mostraron la expresión más alta de RPS6KA3 a 86,2 TPM. Todos los otros tipos de células expresaron RPS6KA3 a 9,2 TPM a 80,4 TPM. Las RPEC mostraron la expresión más alta de RPS6KA6 a 8,75 TPM. Los otros tipos de células evaluados lo expresaron a 0,1 TPM a 4,78 TPM.

La expresión más alta de TECPR1 se observó en monocitos $CD14^+$ a 66,6 TPM con una expresión que varía de 5,2 TPM a 57,5 TPM para otros tipos de células primarias evaluados. Los NHEM exhibieron la expresión más alta de WDR45 a 54,5 TPM y otros tipos de células primarias evaluados expresaron WDR45 en el intervalo de 6,4 TPM a 50,5 TPM. La expresión más alta de STIL fue exhibida por HCAEC a 21,6 TPM y otros tipos de células primarias evaluados exhibieron 0,02 TPM a 18,8 TPM de STIL. Las PBMC expresaron los niveles más altos de SIRPB1 a 19,8 TPM seguido de monocitos CD14+ que exhibieron una expresión de SIRPB1 a 19,3 TPM, y otros tipos de células expresaron < 3,3 TPM de SIRPB1.

SPATA22 se expresa principalmente en los testículos, otros tejidos primarios exhiben expresión de ~1TPM o menos de acuerdo con los datos obtenidos del atlas de proteínas humanas (disponible en internet en proteinatlas.org). En el panel de células primarias

evaluadas en este ensayo, la expresión más alta de SPATA22 se observó en neuronas humanas a 1,04 TPM, seguido de adipocitos a 0,7 TPM, HBSMCs a 0,5 TPM y astrocitos a 0,4 TPM. Todas las otras células primarias evaluadas expresaron SPATA22 en el intervalo de 0 TPM a 0,3 TPM.

ADAMTS20 y TENM1 se expresaron a <1 TPM y <2,5 TPM en los tipos de células primarias evaluados, por lo tanto, se incluyeron líneas de células cancerosas que expresan ADAMTS20 y TENM1 para evaluar la reactividad fuera del objetivo de células T-TCR TSC-204-A0101.

HUVEC exhibieron 1,5 TPM de expresión de CPO y en otros tipos de células primarias evaluados, la expresión de CPO fue <1 TPM. Dado que el CPO se expresa a ~65 TPM en tejidos humanos de acuerdo con los datos obtenidos del atlas de proteínas humanas (disponible en internet en proteinatlas.org) para determinar si existe alguna reactividad de las células T-TCR TSC-204-A0101 a CPO, se transdujeron células HEK A*01:01 con el ORF de CPO y se seleccionaron 3 clones unicelulares que exhiben ~25 a ~65 veces el nivel informado de expresión de CPO como células objetivo.

La expresión de MAGE-A1 se observó en <1 TPM para todas las células primarias evaluadas. La expresión de MAGE-A1 es ampliamente restringida a los testículos.

b. Falta de reactividad inespecífica respecto del tumor de las células T-TCR TSC-204-A0101 a células primarias

Se evaluó la reactividad de TSC-204-A0101 contra un panel seleccionado de 53 células humanas primarias sanas positivas para HLA*01:01. Este panel incluyó células de diversos linajes, tales como células epiteliales, mesenquimales, endoteliales, fibroblásticas, musculares derivadas de múltiples órganos vitales y no vitales, órganos reproductivos y no reproductivos, derivadas de donantes masculinos y femeninos que comprendían los órganos/tejidos que tradicionalmente se evalúan durante los estudios de toxicología.

Como se muestra en la Figura 19, el panel de células primarias incluye una extensa colección de tipos de células que expresaban de manera endógena ZNF202, RPS6KA2, RPS6KA3, RPS6KA6, TECPR1, WDR45, SPATA22, SIRPB1, y STIL, y cualquier reactividad (o falta de las misma) es informativa para la evaluación del riesgo de reactividad fuera del tumor.

Las Figuras 20A-20C proporciona una gráfica representativa que demuestra que no se observó reactividad de tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 y células T de control no transfectados (UTF) compatibles con el donante PD353, PD354 y PD355) cocultivados con (1)

dos lotes de miocitos cardiacos humanos (HCM) positivos para HLA-A*01:01; (2) un lote único de células endoteliales de la arteria coronaria humana (HCAEC) positivas para HLA-A*01:01; (3) tres lotes de fibroblastos pulmonares humanos (HPF) positivos para HLA-A*01:01; o (4) tres lotes de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) positivas para HLA-A*01:01, respectivamente. Se obtuvieron datos y resultados similares para un ensayo en el que los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 y las células T de control no transfectados (UTF) compatibles con el donante (PD353, PD354, y PD355) cocultivados con los otros tipos de células primarias. No se observó reactividad de las células T-TCR TSC-204-A0101 para cualquiera de los tipos de células primarias evaluadas en este estudio. Además, los controles positivos y negativos llevados a cabo como se espera, lo que demuestra la validez de estos ensayos (ver, por ejemplo, Figuras 20A-20C).

c. Expresión de la línea de células cancerosas de elementos fuera del objetivo putativos

Para demostrar la seguridad y la falta de reactividad fuera del objetivo a ADAMTS20, CPO y TENM1, las células T-TCR TSC-204-A0101 y células T de control UTF compatibles con el donante se cocultivaron con un panel seleccionados de líneas celulares cancerosa positivas para HLA-A*01:01 que comprende MHH-ES-1, DMS 79, RPMI-7951, NCI-H524, NCI-H1703, HEK A*01:01 y 3 clones unicelulares HEK A*01:01 que sobreexpresan CPO.

Brevemente, se llevó a cabo RNASeq en líneas celulares MHH-ES-1, DMS 79, RPMI-7951, NCI-H524, NCI-H1703 y HEK A*01:01 para confirmar la expresión de elementos fuera del objetivo putativos en líneas celulares cancerosas utilizadas para evaluar la reactividad fuera del objetivo de las células T-TCR TSC-204-A0101. Como se muestra en la Figura 21, NCI-H1703 mostró una expresión alta de MAGE-A1 (543,7 TPM) y sirvió como un control positivo en este ensayo para demostrar que las células T-TCR son funcionales. Las células HEK A*01:01 expresaron 0 TPM de expresión de MAGE-A1 y sirvieron como una línea celular objetivo de control negativo en este ensayo. RPMI-7951 expresó ~0,4 TPM de MAGE-A1; sin embargo, como se describe más adelante, no exhibieron ninguna reactividad a células T-TCR TSC-204-A0101.

MHH-ES-1 expresaron los niveles más altos de TENM1 a 20,3 TPM; las líneas celulares restantes expresaron TENM1 en el intervalo de 0 TPM a 2,4 TPM. ADAMTS20 se expresa principalmente en la retina a ~0,6 TPM, seguido de los testículos a ~ 0,1 TPM de acuerdo con los datos obtenidos del Atlas de proteínas humanas (disponible en internet en

proteinatlas.org). NCI-H524 que expresaron los niveles más altos de ADAMTS20 a 2,3 TPM; las líneas celulares cancerosas restantes en este ensayo expresaron 0 TPM a 0,85 TPM de ADAMTS20.

Además de ADAMTS20 y TENM1, las células cancerosas también se perfilaron para determinar la expresión de los elementos fuera del objetivo putativos restantes. De forma similar al panel de células primarias, ZNF202, RPS6KA2, RPSKA3, RPS6KA6, TECPR1, WDR45, STIL y SIRPB1 se expresaron a diversos niveles en el panel de 6 líneas de células cancerosas evaluadas. No se observó expresión de SPATA22.

Ya que se expresa CPO a <2 TPM en los lotes de células primarias y en el panel de línea celular cancerosa, se transdujeron células HEK A*01:01 con ORF de CPO y se seleccionaron 3 clones monocelulares que expresan ~25 a ~65 veces los niveles informados de expresión de CPO de acuerdo con los datos obtenidos del Atlas de proteínas humanas (disponibles en internet en proteinatlas.org) para disminuir el riesgo de CPO. Los clones 1, 4 y 10 de la célula simple HEK A*01:01 expresaron 4400 TPM, 2087 TPM y 1792 TPM de CPO, respectivamente. Adicionalmente, los datos de RNAseq revelaron que estos clones también expresaron uno de los niveles más altos de RPS6KA6 a 14,03 TPM, TENM1 a 30,4 TPM y ADAMTS20 a 3,8TPM entre todas las 62 células objetivo incluidas en este estudio.

Estos datos indicaron que las líneas de células cancerosas y clones monocelulares de HEK A*01:01 que sobreexpresan CPO seleccionados para este estudio expresan los elementos fuera del objetivo putativos de células T-TCR TSC-204-A0101 y son útiles para evaluar el riesgo de reactividad fuera del objetivo de células T-TCR TSC-204-A0101.

d. Falta de reactividad de células T-TCR TSC-204-A0101 a elementos fuera del objetivo putativos

Para evaluar la reactividad de células T-TCR TSC-204-A0101 a elementos fuera del objetivo putativos, se cocultivaron 3 lotes de materiales representativos del proceso (PD353, PD354, y PD355) con líneas celulares MHH-ES-1, DMS 79, RPMI-7951, NCI-H524, NCI-H1703 y HEK A*01:01 y se determinaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo como una medición de la reactividad de células T.

Adicionalmente, ya que las células primarias y las 6 líneas celulares cancerosas evaluadas en este estudio expresaron CPO a <1,6 TPM, las células HEK A*01:01 fueron transducidas de forma estable con ORF de CPO. Se seleccionaron 3 clones monocelulares que expresaron

~25 a ~65 veces los niveles indicados de CPO de acuerdo con los datos obtenidos del Atlas de proteínas humanas (disponibles en internet en proteinatlas.org) para evaluar la reactividad de células T-TCR TSC-204-A0101 a CPO. Estos clones HEK A*01:01 monocelulares que sobreexpresan CPO se cocultivaron con células T-TCR TSC-204-A0101 y células T de control UTF y se determinaron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes del cultivo como una medición de reactividad de células T.

Las Figuras 22A-22C proporcionan una gráfica representativa que demuestran que no se observó reactividad de los tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso (PD353, PD354 y PD355) y células T de control no transfectados (UTF) cocultivados con NCI-H524. Específicamente, todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 segregaron IFN-γ en respuesta a células NCI-H524 pulsadas con péptidos. Por otro lado, en ausencia de un pulso de péptidos exógeno, se observaron niveles de referencia de IFN-γ para todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 similares a los observados para células T UTF de control que indica la falta de reactividad de las células T terapéuticos a células cancerosas NCI-H524. Se obtuvieron datos y resultados similares para un ensayo en el que tres lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 representativos del proceso y las células T de control no transfectados (UTF) compatibles con el donante (PD353, PD354, y PD355) cocultivados con las otras líneas celulares cancerosas, inclusive células HEK HLA-A*01:01^{+} que sobreexpresan CPO. Como se muestra en las Figuras 23A-23C, todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 segregaron IFN-γ en respuesta a todos los clones monocelulares HEK A*01:01 pulsados con péptidos que sobreexpresaron CPO de forma estable. De forma importante, en ausencia de un pulso de péptidos exógeno, se observaron niveles de referencia de IFN-γ para todos los lotes de células T-TCR TSC-204-A0101 similares a los observados para células T UTF de control que indica la falta de reactividad de las células T terapéuticos a clones monocelulares HEK A*01:01 que sobreexpresan CPO. No se observó reactividad de las células T-TCR TSC-204-A0101 para cualquiera de las líneas celulares cancerosas evaluadas en este estudio. Además, los controles positivos y negativos llevados a cabo como se espera, lo que demuestra la validez de estos ensayos (ver, por ejemplo, Figuras 22 y 23).

Tomados en conjunto, estos datos confirman adicionalmente que no existe riesgo de reactividad fuera del tumor para TSC-204-A0101 e indican que la reactividad de las células T-

TCR se restringe a las células cancerosas que expresan MAGE-A1 y HLA-A*01:01.

Incorporación a modo de referencia

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en la presente se incorporan a modo de referencia en su totalidad como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual fuera específicamente e individualmente indicada como incorporada a modo de referencia. En el caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo cualquier definición en la presente, prevalecerá.

También se incorpora a modo de referencia en su totalidad cualquier secuencia de polinucleótido y polipéptido cuya referencia a un número de acceso se correlaciona con una entrada a una base de datos pública, tales como aquellas mantenidas por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR) en la Red de Informática Mundial en tigr.org y/o El Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) en la Red de Informática Mundial en ncbi.nlm.nih.gov.

Equivalentes y alcance

En la anterior descripción se han establecido los detalles de una o más formas de realización abarcadas por la presente invención. Aunque anteriormente se han descrito algunos ejemplos de materiales y métodos representativos, en la práctica o ensayo de las formas de realización abarcadas por la presente invención se pueden usar materiales y métodos similares o equivalentes a los que se describen. Otras características, objetos y ventajas relacionados con la presente invención serán evidentes al ver la descripción. A no ser que se los defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el mismo significado con que comúnmente los entiende un especialista en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, predominará la presente descripción que se acaba de proveer.

Aquellos especialistas en la materia reconocerán o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las formas de realización específicas abarcadas por la presente invención que se describe en la presente. No es la intención que el alcance abarcado por la presente invención sea limitado por la descripción que se provee en la presente y la intención es que dichos equivalentes sean abarcados por las reivindicaciones adjuntas.

También se observa que la expresión "que comprende" se usa en un sentido abierto y

permite, pero no requiere la inclusión de elementos ni pasos adicionales. Cuando en la presente se usa la expresión "que comprende", también se incluye y expresa el término "que consiste en".

Donde se dan rangos, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que a no ser que se indique otra cosa o que sea evidente por el contexto y para la comprensión de un especialista en la técnica, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor o subrango específico dentro de los rangos establecidos en las diferentes formas de realización abarcadas por la presente invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior del rango, a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

Además, debe entenderse que cualquier forma de realización particular abarcada por la presente invención que se encuentre dentro de la técnica anterior puede ser excluida explícitamente de una o más de las reivindicaciones. Dado que se considera que tales formas de realización son conocidas para los especialistas en la técnica, pueden excluirse incluso si la exclusión no se establece explícitamente en la presente. Cualquier forma de realización particular de las composiciones abarcadas por la presente invención (por ejemplo, cualquier antibiótico, ingrediente terapéutico o activo; cualquier método de producción; cualquier método de uso; etc.) puede ser excluida de una o más reivindicaciones, por cualquier motivo, relacionado o no con la existencia de arte anterior.

Debe entenderse que las palabras que se han utilizado son palabras descriptivas más que limitativas, y que se pueden realizar cambios dentro del alcance de las reivindicaciones adjunta sin apartarse del verdadero alcance y espíritu que abarca la presente invención en su aspectos más amplios.

Si bien la presente invención se ha descrito con cierta extensión y con alguna particularidad con respecto a las diversas formas de realización que se describen, no es la intención que deba limitarse a dichos detalles ni formas de realización ni a cualquier forma de realización particular, sino que debe interpretarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas, de manera de proveer la interpretación más amplia posible de dichas reivindicaciones en vista del arte anterior y, por lo tanto, para abarcar efectivamente el alcance que se desea que la presente invención abarque.