



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 998 514**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 14/725** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2013 E 20201340 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 3828197**

---

⑮ Título: **Composición farmacéutica que comprende células hospedadoras que codifican receptores de células T anti-NY-ESO-1**

⑯ Prioridad:

**22.05.2012 US 201261650020 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.02.2025**

⑯ Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS  
REPRESENTED BY THE SECRETARY,  
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN  
SERVICES (100.00%)  
6701 Rockledge Drive, Suite 700, MSC 7788  
Bethesda, Maryland 20892-7788, US**

⑯ Inventor/es:

**PARKHURST, MARIA R.;  
MORGAN, RICHARD ARTHUR;  
ROSENBERG, STEVEN A. y  
ROSATI, SHANNON FAITH**

⑯ Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 998 514 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

5 Composición farmacéutica que comprende células hospedadoras que codifican receptores de células T anti-NY-ESO-1

10 **Referencia cruzada a una solicitud relacionada**

15 Esta solicitud de patente reclama el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 61/650.020, presentada el 22 de mayo de 2012.

20 **Incorporación como referencia de material enviado electrónicamente**

25 Junto con la presente se presenta una lista de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por ordenador e identificada de la siguiente manera: un archivo ASCII (texto) de 23.462 bytes llamado "713415ST25.TXT", con fecha del 30 de abril de 2013.

30 **Antecedentes de la invención**

35 La terapia con células adoptivas puede ser un tratamiento eficaz para el cáncer en algunos pacientes. Sin embargo, todavía existen obstáculos para el éxito general de la terapia celular adoptiva. Por ejemplo, solo 50% de las muestras de tumores de melanoma pueden generar células T reactivas a tumores. También puede resultar difícil generar células T reactivas a tumores a partir de cánceres distintos del melanoma. Además, muchos pacientes pueden no tener un tumor que sea susceptible de resección quirúrgica. Por consiguiente, existe la necesidad de receptores de células T para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer. Robbins et al. describen una variante del receptor de células T anti-NY-ESO-1 1G4, y muestra que la transferencia adoptiva de células T autólogas transducidas con un vector retroviral que codifica un TCR (una variante de 1G4) contra NY-ESO-1<sub>aa157-185</sub> media en la regresión tumoral en pacientes con melanoma metastásico y sarcoma de células sinoviales.

40 **Breve compendio de la invención**

45 La invención proporciona las siguientes realizaciones bajo los artículos 1-15:

50 1. Una composición farmacéutica que comprende (a) un vehículo farmacéuticamente aceptable y (b) una población de células que comprende al menos una célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante, en donde el vector de expresión recombinante comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de células T (TCR) aislado o purificado,

55 en donde el TCR comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad (CDR) 1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, y tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1),

60 en donde la composición farmacéutica es (i) una formulación parenteral, (ii) una formulación intravenosa o (iii) una formulación inyectable.

65 2. La composición farmacéutica del artículo 1, en donde el TCR tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1<sub>157-165</sub> (SEQ ID NO: 2).

70 3. La composición farmacéutica del artículo 1 o 2, en donde el TCR comprende:

75 (a) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10; o  
(b) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12.

80 4. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-3, en donde la población de células es:

85 (a) autóloga para el receptor previsto; o  
(b) alogénica para el receptor previsto.

90 5. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-4, en donde la secuencia de nucleótidos tiene codones optimizados.

95 6. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-5, en donde la secuencia de nucleótidos comprende SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, tanto SEQ ID NO: 15 como 16, o tanto SEQ ID NO: 19 como 20.

100 7. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-6, en donde la secuencia de nucleótidos que

codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 está situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, opcionalmente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 17.

8. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-6, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 está situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, opcionalmente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 18.

9. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-8, en donde las células son humanas.

10. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-9, en donde la composición farmacéutica es una formulación parenteral.

11. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-9, en donde la composición farmacéutica es una formulación intravenosa.

12. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-9, en donde la composición farmacéutica es una formulación inyectable.

13. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-12, en donde la composición farmacéutica comprende solución salina.

14. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-13, en donde la composición farmacéutica es isotónica con la sangre del receptor previsto.

15. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los artículos 1-14, en donde la composición farmacéutica comprende una solución de inyección estéril acuosa que es isotónica con la sangre del receptor previsto.

35 En la presente memoria se describe pero no es parte de la invención un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1 y que comprende una región variable murina. La descripción también proporciona polipéptidos y proteínas relacionados, así como a ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas y poblaciones de células relacionados. Adicionalmente, se divultan anticuerpos, o una porción de unión a antígeno de los mismos, y composiciones farmacéuticas relacionadas con los TCR.

45 En la presente memoria se describen adicionalmente pero no son parte de la invención métodos para detectar la presencia de cáncer en un mamífero y métodos para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero. El método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende células del cáncer con cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células anfitrionas, o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria, formando así un complejo, y (ii) detectar el complejo, en donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

50 El método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero descrito en la presente memoria pero no es parte de la invención comprende administrar al mamífero cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, o cualquier célula anfitriona o población de células anfitrionas que comprenda un vector recombinante que codifique cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

#### Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

60 Las Figuras 1A y 1B son gráficos que muestran la secreción de interferón (IFN)-γ por células T CD8+ (Figura 1A) o CD4+ (Figura 1B) humanas transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (círculos sombreados) o un TCR anti-NY-ESO-1 humano (círculos sin sombrear) en cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con diversas concentraciones de NY-ESO-1<sub>157-165</sub>.

65 Las Figuras 2A y 2B son gráficos que muestran la secreción de IFN-γ por células T CD8+ (Figura 2A) o CD4+

(Figura 2B) humanas transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (barras sombreadas) o un TCR anti-NY-ESO-1 humano (barras sin sombrear) cultivado solo (medio) o cultivado conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control, células T2 pulsadas con péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub>, o una de varias líneas de células tumorales 888mel (NY-ESO-1<sup>-</sup>), Sk23mel (NY-ESO-1<sup>-</sup>), COA-A2-CEA (NY-ESO-1<sup>-</sup>), A375mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), 1363mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>) o COS-A2-ESO (NY-ESO-1<sup>+</sup>).

5

#### Descripción detallada de la invención

10 En la presente memoria se describe pero no es parte de la invención un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que tiene especificidad antigenica para NY-ESO-1 y que comprende una región variable murina. NY-ESO-1 es un antígeno de cáncer de testículo (CTA), que se expresa únicamente en células tumorales y en células germinales de testículo y placenta que no expresan MHC. NY-ESO-1 se expresa en una variedad de cánceres humanos que incluyen, pero no se limitan a, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de ovario y sarcoma de células sinoviales. La proteína NY-ESO-1 puede comprender, consistir o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 1.

15

20 El TCR puede tener especificidad antigenica para cualquier proteína, polipéptido o péptido NY-ESO-1. El TCR descrito en la presente memoria tiene especificidad antigenica para una proteína NY-ESO-1 que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, SEQ ID NO: 1. El TCR descrito en la presente memoria tiene especificidad antigenica para un péptido NY-ESO-1 157-165 que comprende, consiste de, o que consiste esencialmente en, SLLMWITQC (SEQ ID NO: 2).

25 La frase "que tiene especificidad antigenica", como se emplea en la presente memoria, significa que el TCR puede unirse específicamente a, y reconocer inmunológicamente, NY-ESO-1, de manera que la unión del TCR a NY-ESO-1 provoca una respuesta inmunitaria.

30 Los TCR descritos en la presente memoria son capaces de reconocer NY-ESO-1 de una manera dependiente de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Por "manera dependiente de MHC de clase I" como se emplea en la presente memoria significa que el TCR provoca una respuesta inmunitaria al unirse a NY-ESO-1 dentro del contexto de una molécula de MHC de clase I. La molécula de MHC de clase I puede ser cualquier molécula de MHC de clase I conocida en la técnica, p. ej., moléculas HLA-A. La molécula del MHC de clase I descrita en la presente memoria es una molécula HLA-A2.

35 Los TCR descritos en la presente memoria comprenden una región variable murina. Los TCR pueden comprender adicionalmente una región constante derivada de cualquier especie adecuada tal como, p. ej., un ser humano o un ratón. Preferiblemente, los TCR comprenden adicionalmente una región constante murina. En una realización especialmente preferida, los TCR de la invención son TCR murinos que comprenden tanto una región variable murina como una región constante murina.

40 Como se emplea en la presente memoria, el término "murino", cuando se refiere a un TCR o cualquier componente de un TCR descrito en la presente memoria (p. ej., región determinante de complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena alfa y/o cadena beta), significa un TCR (o un componente del mismo) que se obtiene de un ratón, es decir, un TCR (o un componente del mismo) que se originó o fue, en un momento, expresado por una célula T de ratón. De manera deseable, el TCR (o componente del mismo) se expresa en la superficie de una célula anfitriona humana.

45

50 Los TCR descritos en la presente memoria proporcionan muchas ventajas, incluso cuando se utilizan para la transferencia de células adoptivas. Por ejemplo, sin estar ligado a una teoría o mecanismo concretos, se cree que debido a que NY-ESO-1 es expresado por células de múltiples tipos de cáncer, los TCR de la invención proporcionan ventajosamente la capacidad de destruir células de múltiples tipos de cáncer y, en consecuencia, tratar o prevenir múltiples tipos de cáncer. Además, sin estar ligado a una teoría o mecanismo concretos, se cree que debido a que NY-ESO-1 es un antígeno de cáncer de testículo que se expresa solo en células tumorales y en células germinales de testículo y placenta que no expresan MHC, los TCR descritos en la presente memoria, se dirige ventajosamente a la destrucción de células cancerosas mientras se minimiza o elimina la destrucción de células normales no cancerosas, reduciendo así, p. ej., minimizando o eliminando la toxicidad. También se cree que los TCR murinos pueden proporcionar una mayor expresión (p. ej., mayor número de TCR) sobre la superficie de una célula anfitriona humana y/o una mayor funcionalidad (medida por, p. ej., liberación de citocinas y citotoxicidad) en comparación con un TCR humano. Sin estar ligado a una teoría concreta del mecanismo, se cree que la expresión y/o funcionalidad mejoradas resulta de una reducción en la mezcla de cadenas de TCR endógenas y exógenas (transducidas) en la célula anfitriona. Por consiguiente, se cree que los TCR murinos pueden reemplazar los TCR endógenos sobre la superficie de una célula anfitriona humana más eficazmente que un TCR humano exógeno. También se cree que los TCR murinos proporcionan un emparejamiento mejorado de cadenas de TCR y/o interacciones mejoradas con el complejo CD3 de la célula anfitriona humana en comparación con los TCR humanos exógenos expresados por una célula anfitriona humana.

60

65 En la presente memoria se describe un TCR que comprende dos polipéptidos (es decir, cadenas polipeptídicas), tal

como una cadena  $\alpha$  de un TCR, una cadena  $\beta$  de un TCR, una cadena  $\gamma$  de un TCR, una cadena  $\delta$  de un TCR o una combinación de las mismas. Los polipéptidos del TCR de la invención pueden comprender cualquier secuencia de aminoácidos, siempre que el TCR tenga especificidad antigenica para NY-ESO-1 y comprenda una región variable murina.

5 El TCR descrito en la presente memoria comprende dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende una región variable que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1, una CDR2 y una CDR3 de un TCR. Preferiblemente, la primera cadena polipeptídica comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3 (CDR1 de la cadena  $\alpha$ ), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4 (CDR2 de la cadena  $\alpha$ ) y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (CDR3 de cadena  $\alpha$ ), y la segunda cadena polipeptídica comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena  $\beta$ ), una CDR2 que comprende el aminoácido secuencia de SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena  $\beta$ ), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena  $\beta$ ). A este respecto, el TCR de la invención puede comprender las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3-5, 6-8 y 3-8. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3-8.

20 De forma alternativa o adicional, el TCR puede comprender una secuencia de aminoácidos de una región variable de un TCR que comprende las CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena  $\alpha$ ) o 10 (la región variable de una cadena  $\beta$ ), o tanto SEQ ID NO: 9 como 10. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 10.

25 Alternativa o adicionalmente, el TCR puede comprender una cadena  $\alpha$  de un TCR y una cadena  $\beta$  de un TCR. Cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR puede comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena  $\alpha$  comprende la región variable de una cadena  $\alpha$  como se expuso anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Un TCR de este tipo puede emparejarse con cualquier cadena  $\beta$  de un TCR. Preferiblemente, la cadena  $\beta$  del TCR comprende la región variable de una cadena  $\beta$  como se ha expuesto anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. El TCR, por lo tanto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o 12, o tanto SEQ ID NO: 11 como 12. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 y 12.

35 También se proporciona por la descripción pero no es parte de la invención un polipéptido aislado o purificado que comprende una porción funcional de cualquiera de los TCR descritos en la presente memoria. El término "polipéptido", como se emplea en la presente memoria, incluye oligopéptidos y se refiere a una cadena sencilla de aminoácidos conectados por uno o más enlaces peptídicos.

40 Con respecto a los polipéptidos, la porción funcional puede ser cualquier parte que comprenda aminoácidos contiguos del TCR del que forma parte, siempre que la porción funcional se una específicamente a NY-ESO-1. El término "porción funcional" cuando se utiliza en referencia a un TCR se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR descrito en la presente memoria, cuya parte o fragmento conserva la actividad biológica del TCR del cual es parte (el TCR parental). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR que conservan la capacidad de unirse específicamente a NY-ESO-1, o detectan, tratan o previenen el cáncer, en un grado similar, en el mismo grado o en un grado mayor, como el TCR parental. En referencia al TCR parental, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más del TCR parental.

45 0  
50 La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi terminal de la porción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR parental. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren en la función biológica de la porción funcional, p. ej., se unen específicamente a NY-ESO-1, tienen la capacidad de detectar cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR parental.

55 55 El polipéptido puede comprender una porción funcional de una o ambas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de los TCR, tal como una porción funcional que comprende una o más de CDR1, CDR2 y CDR3 de la región o regiones variables de la cadena  $\alpha$  y/o cadena  $\beta$  de un TCR. A este respecto, el polipéptido puede comprender una porción funcional que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena  $\alpha$ ), 4 (CDR2 de cadena  $\alpha$ ), 5 (CDR3 de cadena  $\alpha$ ), 6 (CDR1 de cadena  $\alpha$ ), 7 (CDR2 de cadena  $\beta$ ), 8 (CDR3 de cadena  $\beta$ ) o una combinación de las mismas. Preferiblemente, el polipéptido comprende una porción funcional que comprende SEQ ID NO: 3-5, 6-8, o la totalidad de SEQ ID NO: 3-8. Más preferiblemente, el polipéptido comprende una porción funcional que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.

65 65 Alternativa o adicionalmente, el polipéptido puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR de la invención que comprende una combinación de las regiones CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el TCR

puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena  $\alpha$ ) o 10 (la región variable de una cadena  $\beta$ ), o tanto SEQ ID NO: 9 como 10. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10.

- 5      Alternativa o adicionalmente, el polipéptido puede comprender la longitud completa de una cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de uno de los TCR descritos en la presente memoria. A este respecto, el polipéptido de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o 12. Alternativamente, el polipéptido puede comprender ambas cadenas de los TCR descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede comprender ambas secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12.
- 10     Se desvela además pero no es parte de la invención una proteína aislada o purificada que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por "proteína" se entiende una molécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas.
- 15     La proteína descrita en la presente memoria puede comprender una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. La proteína descrita en la presente memoria puede, por ejemplo, comprender una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En este caso, la proteína de la invención puede ser un TCR. Alternativamente, si, p. ej., la proteína comprende una única cadena polipeptídica que comprende SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o si la primera y/o segunda cadenas polipeptídicas de la proteína comprenden adicionalmente otras secuencias de aminoácidos, p. ej., una secuencia de aminoácidos que codifica una inmunoglobulina o una porción de la misma, la proteína puede ser una proteína de fusión. A este respecto, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria junto con al menos otro polipéptido. El otro polipéptido puede existir como un polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede existir como un polipéptido, que se expresa en marco (en tandem) con uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria. El otro polipéptido puede codificar cualquier molécula peptídica o proteica, o una porción de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a, una inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula del MHC, una molécula CD1, p. ej., CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.
- 20     La proteína de fusión puede comprender una o más copias del polipéptido y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más copias del polipéptido y/o del otro polipéptido. Los métodos adecuados para preparar proteínas de fusión se conocen en la técnica e incluyen, p. ej., métodos recombinantes. Véase, p. ej., Choi et al., Mol. Biotechnol. 31: 193-202 (2005).
- 25     Los TCR, polipéptidos y proteínas (que incluyen porciones funcionales y variantes funcionales) se pueden expresar como una única proteína que comprende un péptido conector que conecta la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$ . Se puede utilizar cualquier péptido conector adecuado para conectar la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  en los TCR, polipéptidos y proteínas (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales) de la invención. En una realización, el péptido conector es un péptido de picornavirus 2A. A este respecto, los TCR, polipéptidos y proteínas (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales) pueden comprender adicionalmente un péptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID NO: 13. El péptido conector puede facilitar ventajosamente la expresión de un TCR, polipéptido y/o proteína recombinantes en una célula anfitriona. Tras la expresión de la construcción que incluye el péptido conector por una célula anfitriona, el péptido conector se puede escindir, dando como resultado cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  separadas.
- 30     La proteína descrita en la presente memoria puede ser un anticuerpo recombinante que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente memoria. Como se emplea en la presente memoria, "anticuerpo recombinante" se refiere a una proteína recombinante (p. ej., modificada genéticamente) que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención y una cadena polipeptídica de un anticuerpo, o una porción del mismo. El polipéptido de un anticuerpo, o porción del mismo, puede ser una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable o constante de una cadena pesada o ligera, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) o un fragmento Fc, Fab o F(ab)<sub>2</sub> de un anticuerpo, etc. La cadena polipeptídica de un anticuerpo, o porción del mismo, puede existir como un polipéptido separado del anticuerpo recombinante. Alternativamente, la cadena polipeptídica de un anticuerpo, o porción del mismo, puede existir como un polipéptido, que se expresa en marco (en tandem) con el polipéptido de la invención. El polipéptido de un anticuerpo, o porción del mismo, puede ser un polipéptido de cualquier anticuerpo o cualquier fragmento de anticuerpo, incluyendo cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente memoria.
- 35     En la presente memoria se describen además variantes funcionales de los TCR, polipéptidos y proteínas inventivos descritos en la presente memoria. El término "variante funcional" como se emplea en la presente memoria se refiere a un TCR, polipéptido o proteína que tiene una identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con un TCR, polipéptido o proteína parental, cuya variante funcional conserva la actividad biológica del TCR, polipéptido o proteína de la que es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del TCR, polipéptido o proteína descritos en la presente memoria (el TCR, polipéptido o proteína original) que conservan la capacidad de unirse específicamente a NY-ESO-1 en un grado similar, en el mismo grado o, en un mayor grado, que

el TCR, polipéptido o proteína parentales. En referencia al TCR, polipéptido o proteína parentales, la variante funcional puede ser, p. ej., al menos aproximadamente 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica en secuencia de aminoácidos al TCR, polipéptido o proteína parentales.

- 5 La variante funcional puede comprender, p. ej., la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína parentales con al menos una sustitución conservativa de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son conocidas en la técnica e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos conservativa puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (p. ej., Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituida por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (p. ej., Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido alcalino sustituido por otro aminoácido alcalino (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.
- 10 15 Alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína parental con al menos una sustitución de aminoácidos no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservativa no interfiera o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos no conservativa potencia la actividad biológica de la variante funcional, de manera que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con el TCR, polipéptido o proteína parentales.

20 El TCR, polipéptido o proteína pueden consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en la presente memoria, de modo que los otros componentes de la variante funcional, p. ej., otros aminoácidos, no cambien materialmente la actividad biológica de la variante funcional. A este respecto, el TCR, polipéptido o proteína pueden, p. ej., consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 1047

Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.449.752. Asimismo, los polipéptidos y las proteínas se pueden producir de forma recombinante utilizando los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria utilizando métodos recombinantes convencionales. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los TCR, polipéptidos y proteínas (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden aislar y/o purificar a partir de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, p. ej., un ratón, un ser humano, etc. Los métodos de aislamiento y purificación son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, los TCR, polipéptidos y/o proteínas descritos en la presente memoria (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden ser sintetizados comercialmente por compañías, tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

En la presente memoria se describen adicionalmente productos conjugados, p. ej., bioconjungados, que comprenden cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas de la invención (incluida cualquiera de las porciones funcionales o variantes de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfítrionas, poblaciones de células anfítrionas o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos. Los productos conjugados, así como los métodos para sintetizar conjugados en general, son conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) y Kirin et al., *Inorg Chem.* 44(15): 5405-5415 (2005)).

Se proporciona adicionalmente por la descripción pero no es parte de la invención un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos).

Por "ácido nucleico", como se emplea en la presente memoria, se incluyen "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, sintetizado u obtenido (p. ej., aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosforamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster que se encuentra entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. Generalmente se prefiere que el ácido nucleico no comprenda inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, como se comenta en la presente memoria, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

Preferiblemente, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria son recombinantes. Como se emplea en la presente memoria, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas al unir segmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de los descritos en el apartado (i) más arriba. Para los propósitos de la presente memoria, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

Los ácidos nucleicos se pueden construir basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Sambrook et al., más arriba y Ausubel et al., más arriba. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de diversas formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (p. ej., derivados fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N<sup>6</sup>-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden adquirir en empresas tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas, o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 19 (cadena α de tipo salvaje) o SEQ ID NO: 20 (cadena β de tipo salvaje) o tanto SEQ ID NO: 19 como 20.

La secuencia de nucleótidos puede tener codones optimizados. Sin estar ligado a una teoría o mecanismo

concretos, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficacia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización de codones de la secuencia de nucleótidos puede implicar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifica el mismo aminoácido, pero 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 de ARNm secundarias que interferirían en la traducción, aumentando así la eficacia de la traducción. En una realización, la secuencia de nucleótidos con codones optimizados puede comprender, consistir o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 15 (cadena  $\alpha$  con codones optimizados), SEQ ID NO: 16 (cadena  $\beta$  con codones optimizados), SEQ ID NO: 21 (región variable con codones optimizados de la cadena  $\alpha$ ), SEQ ID NO: 22 (región variable con codones optimizados de la cadena  $\beta$ ), tanto SEQ ID NO: 15 como 16, tanto SEQ ID NO: 21 como 22, tanto SEQ ID NO: 15 como 20, o tanto SEQ ID NO: 16 como 19.

La secuencia de nucleótidos que codifica los TCR, polipéptidos y proteínas (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los péptidos conectores descritos en la presente memoria con respecto a otros aspectos de la invención. En una realización, el péptido conector puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 14.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 70% o más, p. ej., aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

La secuencia de nucleótidos alternativamente puede comprender una secuencia de nucleótidos que es degenerada respecto a SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, tanto SEQ ID NO: 15 como 16, tanto SEQ ID NO: 19 como 20, tanto SEQ ID NO: 21 como 22, tanto SEQ ID NO: 15 como 20, o tanto SEQ ID NO: 16 como 19. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 15, 16, 19, 20, 21 o 22, SEQ ID NO: 15 y 16, SEQ ID NO: 19 y 20, SEQ ID NO: 21 y 22, SEQ ID NO: 15 y 20, o SEQ ID NO: 16 y 19, o una secuencia de nucleótidos que es degenerada respecto a la misma.

También se describe en la presente memoria un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria o una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

La secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas preferiblemente hibrida en condiciones muy rigurosas. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia de nucleótidos hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que contuviera solo unos pocos emparejamientos erróneos dispersos de una secuencia aleatoria que tuviera unas pocas regiones pequeñas (p. ej., 3-10 bases) que coincidirían con la secuencia de nucleótidos. Estas pequeñas regiones de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento completo de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirían, por ejemplo, condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl aproximadamente 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70°C. Tales condiciones de alta rigurosidad toleran poco, si lo hicieran, el emparejamiento erróneo entre la secuencia de nucleótidos y la hebra molde o diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR de la invención. Generalmente se aprecia que las condiciones se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

Los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector de expresión recombinante. A este respecto, la descripción proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Para los fines de la presente memoria, el término "vector de expresión recombinante" significa una construcción de oligonucleótidos o polinucleótidos modificada genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula anfitriona, cuando la construcción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para que el ARNm, proteína, polipéptido o péptido se expresen dentro de la célula. Los vectores de la invención no son de origen natural en su conjunto. Sin embargo, partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluidos, entre otros, ADN y ARN, que pueden ser de hebra sencilla o de doble hebra, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender conexiones internucleotídicas de origen natural y de origen no natural, o ambos tipos de conexiones. Preferiblemente, los nucleótidos o enlaces internucleotídicos

alterados o no naturales no obstaculizan la transcripción o replicación del vector.

El vector de expresión recombinante descrito en la presente memoria puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado y se puede utilizar para transformar o transfectar cualquier célula anfitriona adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o para expresión o ambos, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consta de la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También se pueden utilizar vectores de bacteriófagos, tales como  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 y  $\lambda$ TM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-Cl, pMAM y pMAMneo (Clontech). Preferiblemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, p. ej., un vector retroviral o un vector lentiviral.

Los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria se pueden preparar utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante descritas, p. ej., en Sambrook et al., más arriba, y Ausubel et al., más arriba. Las construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, se pueden prepararse para contener un sistema de replicación funcional en una célula anfitriona procariota o eucariota. Los sistemas de replicación se pueden obtener, p. ej., de ColE1, plásmido de 2 $\mu$ m,  $\lambda$ , SV40, virus del papiloma bovino y similares.

Deseablemente, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicas del tipo de célula anfitriona (p. ej., bacteria, hongo, planta o animal) en la que se va a introducir el vector, según corresponda y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células anfitrionas transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, p. ej., resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un anfitrión auxótrofo para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo conectado operablemente a la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR, polipéptido o proteína (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria, o que hibrida con, la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR, polipéptido o proteína. La selección de promotores, p. ej., fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos del desarrollo, está dentro del conocimiento práctico normal del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro del conocimiento práctico del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, p. ej., un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV y un promotor que se encuentra en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden diseñar para la expresión transitoria, para la expresión estable o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar para la expresión constitutiva o para la expresión inducible. Adicionalmente, se puede hacer que los vectores de expresión recombinantes incluyan un gen suicida.

Como se emplea en la presente memoria, el término "gen suicida" se refiere a un gen que hace que muera la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, p. ej., un fármaco, a la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto o se expone al agente. Los genes suicidas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, e incluyen, p. ej., el gen de la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), la citosina desaminasa, la purina nucleósido fosforilasa y la nitróreductasa).

Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una parte de la cadena alfa situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una parte de la cadena beta. A este respecto, una realización proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$  y CDR3 $\beta$ , y la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$  y CDR3 $\alpha$  está situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$  y CDR3 $\beta$ . Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$  y CDR3 $\beta$  puede estar situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$  y CDR3 $\alpha$ . El vector de expresión recombinante puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena alfa y una región variable de la cadena beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa está situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta. Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta puede estar situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa. El vector de expresión recombinante puede comprender también una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena alfa y una cadena

5 beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa está situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta. Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta puede estar situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa. El vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta puede comprender SEQ ID NO: 17.

10 Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta. Sin estar ligado a una teoría o mecanismo concretos, se cree que un TCR, polipéptido o proteína (o porción funcional o variante de los mismos) codificados por un vector de expresión recombinante en el que la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa está situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta proporciona mejor funcionalidad y reconocimiento de antígeno en comparación con un TCR, polipéptido o proteína (o porción funcional o variante funcional de los mismos) codificados por un vector de expresión recombinante en el que la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una parte de la cadena alfa está situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una parte de la cadena beta. A este respecto, la descripción proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una CDR 1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$  y CDR3 $\beta$ , y la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$  y CDR3 $\alpha$  está situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos, que codifica CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$  y CDR3 $\beta$ . Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$  y CDR3 $\beta$  puede estar situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$  y CDR3 $\alpha$ . En otra realización de la descripción, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena alfa y una región variable de la cadena beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa está situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta. Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta puede estar situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa. En otra realización más de la invención, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena alfa y una cadena beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa está situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta. Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta puede estar situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa. El vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta puede comprender SEQ ID NO: 18.

35 El vector de expresión recombinante puede comprender una etiqueta de ADN. La etiqueta de ADN puede distinguir el vector de expresión recombinante de otro vector que codifica la misma secuencia de proteína. La etiqueta de ADN puede no estar incluida dentro de la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR de la invención (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), polipéptido o proteína y, por lo tanto, puede no afectar a su expresión. Los vectores de expresión recombinantes que incluyen la etiqueta de ADN permiten poner la misma secuencia de nucleótidos en varias poblaciones de células diferentes y, posteriormente, distinguir entre esas poblaciones en función del vector que contienen.

40 La descripción proporciona adicionalmente una célula anfitriona que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria. Como se emplea en la presente memoria, el término "célula anfitriona" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula anfitriona puede ser una célula eucariótica, p. ej., una planta, animal, hongos o algas, o puede ser una célula procariótica, p. ej., bacterias o protozoos. La célula anfitriona puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, p. ej., un ser humano. La célula anfitriona puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células anfitrionas adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, células *E. coli* DH5 $\alpha$ , células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Con el fin de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula anfitriona es preferiblemente una célula procariótica, p. ej., una célula DH5 $\alpha$ . Con el fin de producir un TCR, polipéptido o proteína recombinantes, la célula anfitriona es preferiblemente una célula de mamífero. Lo más preferiblemente, la célula anfitriona es una célula humana. Si bien la célula anfitriona puede ser de cualquier tipo de célula, se puede originar a partir de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, la célula anfitriona puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Preferiblemente, la célula anfitriona puede ser una célula T.

45 Para los fines de la presente memoria, la célula T puede ser cualquier célula T, como una célula T cultivada, p. ej., una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivada, p. ej., Jurkat, SupT1, etc., o una célula T 50 obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden enriquecer o purificar. La célula T puede ser una célula T humana. La célula T puede ser una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluidos, entre otros, células T dobles positivas CD4 $^+$ /CD8 $^+$ , células T auxiliares CD4 $^+$ , p. ej., células Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, células T CD8 $^+$ , células T citotóxicas, células de linfocitos infiltrantes de tumores, células T de memoria, células T vírgenes y similares. Preferiblemente, la célula T puede ser una célula T CD8 $^+$  o una célula T CD4 $^+$ .

- 5 Se describe adicionalmente en la presente memoria una población de células que comprende al menos una célula anfitriona descrita en la presente memoria. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula anfitriona que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, p. ej., una célula anfitriona (p. ej., una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta de una célula T, p. ej., una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células anfitrionas (p. ej., que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula anfitriona que comprende un vector de expresión recombinante, de manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la descripción, la población de células es una población clonal que comprende células anfitrionas que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en la presente memoria.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Se describe además pero no es parte de la invención un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una porción funcional de cualquiera de los TCR descritos en la presente memoria. Preferiblemente, la porción funcional se une específicamente a NY-ESO-1, p. ej., la porción funcional que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena  $\alpha$ ), 4 (CDR2 de cadena  $\alpha$ ), 5 (CDR3 de cadena  $\alpha$ ), 6 (CDR1 de cadena  $\beta$ ), 7 (CDR2 de cadena  $\beta$ ), 8 (CDR3 de cadena  $\beta$ ), SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o una combinación de los mismos, p. ej., 3-5, 6-8, 3-8 o 9-10. Más preferiblemente, la porción funcional comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8. En una realización preferida, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, se une a un epitopo que está formado por las 6 CDR (CDR1-3 de la cadena alfa y CDR1-3 de la cadena beta). El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isótipo, p. ej., IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de origen natural, p. ej., un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, p. ej., ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado genéticamente, p. ej., un anticuerpo humanizado o un anticuerpo químico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Asimismo, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidez por la porción funcional del TCR de la invención. De manera deseable, el anticuerpo es específico para la porción funcional del TCR de la invención, de manera que existe una reacción cruzada mínima con otros péptidos o proteínas.
- Los métodos de prueba de anticuerpos para determinar la capacidad de unirse a cualquier porción funcional del TCR son conocidos en la técnica e incluyen cualquier ensayo de unión de anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitivos (véase, p. ej., Janeway et al., más abajo).
- Se conocen en la técnica métodos adecuados para preparar anticuerpos. Por ejemplo, los métodos de hibridoma convencionales son descritos, p. ej., por Köhler y Milstein, en Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5<sup>a</sup> Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Alternativamente, otros métodos, tales como los métodos de EBV-hibridoma (Haskard y Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), y Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986)) y sistemas de expresión de vectores de bacteriófagos (véase, p. ej., Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)) son conocidos en la técnica. Adicionalmente, los métodos para producir anticuerpos en animales no humanos se describen, p. ej., en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352).
- Además, la presentación de fagos se puede utilizar para generar el anticuerpo descrito en la presente memoria. A este respecto, se pueden generar bibliotecas de fagos que codifican dominios de anticuerpos variables de unión a antígenos (V) utilizando biología molecular convencional y técnicas de ADN recombinante (véase, p. ej., Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001)). Los fagos que codifican una región variable con la especificidad deseada se seleccionan para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido se introducen en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma utilizada para la producción de hibridomas, de manera que los anticuerpos que tienen las características de los anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véanse, p. ej., Janeway et al., más arriba, Huse et al., más arriba y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.265.150).
- Los ratones transgénicos pueden producir anticuerpos que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada específicos. Tales métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.545.806 y 5.569.825 y Janeway et al., más arriba.
- Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica y son descritos en detalle, p. ej., por Janeway et al., más arriba, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la Patente Europea Núm. 0239400 B1 y la Patente del Reino Unido Núm. 2188638. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar utilizando la tecnología de reconstrucción de la superficie de anticuerpos descrita en la

Patente de Estados Unidos Núm. 5.639.641 y Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994).

La descripción también proporciona porciones de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria. La porción de unión al antígeno puede ser cualquier porción que tenga al menos un sitio de unión al antígeno, tal como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

5 Se puede generar un fragmento de anticuerpo de un fragmento de región variable de cadena sencilla (sFv), que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo conectada a un dominio V de una cadena de anticuerpo ligero a través de un péptido sintético utilizando técnicas de 10 tecnología de ADN recombinante de rutina (véase, p. ej., Janeway et al., más arriba). De manera similar, se pueden preparar los fragmentos de región variable estabilizados con disulfuro (dsFv) mediante tecnología de ADN recombinante (ver, p. ej., Reiter et al., Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)). Los fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria, sin embargo, no se limitan a estos tipos ilustrativos de fragmentos de anticuerpos.

15 Asimismo, el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, se puede modificar para que comprenda un marcador detectable, tal como, p. ej., un radioisótopo, un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro).

20 Los TCR, polipéptidos, proteínas (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfítrionas (incluidas poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluidas porciones de unión a antígenos de los mismos) se pueden aislar y/o purificarse. El término "aislado", como se emplea en la presente memoria, significa haber sido retirado de su entorno natural. El término "purificado" como se emplea en la presente memoria significa haber aumentado en pureza, en donde "pureza" es un 25 término relativo, y no debe interpretarse necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente 50%, puede ser superior a 60%, 70% u 80%, o puede ser de 100%.

30 Los TCR, polipéptidos, proteínas (incluidas las porciones funcionales y variantes de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfítrionas (incluidas las poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluidas las porciones de unión a antígenos de los mismos), todos los cuales se denominan colectivamente "materiales de TCR" en lo sucesivo, se pueden formular en una composición, tal como una composición farmacéutica. A este respecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, porciones funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células anfítrionas (incluidas las poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluidas las porciones de 35 unión a antígenos de los mismos), y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas inventivas que contienen cualquiera de los materiales de TCR descritos en la presente memoria pueden comprender más de un material de TCR, p. ej., un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más TCR diferentes. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR combinado con otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, p. ej., asparraginasa, busulfano, carboplatino, 40 cisplatino, daunorrubicina, doxorrubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

45 Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los utilizados convencionalmente y está limitado solo por consideraciones químico-físicas, tales como la solubilidad y falta de reactividad con el compuesto o compuestos activos, y por la vía de administración. Los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria, p. ej., vehículos, coadyuvantes, excipientes y diluyentes, son bien conocidos por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte para el agente o agentes activos y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

50 La elección del portador estará determinada en parte por el material de TCR concreto, así como por el método concreto utilizado para administrar el material de TCR. Por consiguiente, existe una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las siguientes formulaciones para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal e interperitoneal son ilustrativas y de ninguna manera son limitantes. Se puede utilizar más de una vía para administrar los materiales de TCR inventivos y, en ciertos casos, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

60 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables isotónicas estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. El material de TCR se puede administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido o una mezcla de líquidos estériles, que incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones azucaradas relacionadas, un alcohol, tal como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, tal como propileneglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres,

polí(etylenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos o glicéridos o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros coadyuvantes farmacéuticos.

- 5 Los aceites que se pueden utilizar en las formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen cacahuate, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y mineral. Los ácidos grasos adecuados para uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.
- 10 Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metales alcalinos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, alquil-, aril- y olefino-sulfonatos, alquil-, olefino-, éter- y monoglicérido-sulfatos y -sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietilenopolipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-β-aminopropionatos y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.
- 15
- 20 Las formulaciones parenterales contendrán típicamente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 25% en peso del material de TCR de la invención en solución. Se pueden utilizar conservantes y tampones. Para minimizar o eliminar la irritación en el lugar de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tengan un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones variará típicamente de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitán y polietilenglicol, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de óxido de etileno de alto peso molecular con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en envases sellados de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado seco mediante congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del excipiente líquido estéril, p. ej., agua, para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.
- 25
- 30
- 35 También se proporcionan por la descripción formulaciones inyectables. Los requisitos de los portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker and Chalmers, ed., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4<sup>a</sup> ed., páginas 622-630 (1986)). Preferiblemente, cuando se administran células, p. ej., células dendríticas, las células se administran mediante inyección.
- 40 Un experto en la técnica apreciará que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, los materiales de TCR descritos en la presente memoria se pueden formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina o liposomas.
- 45 La cantidad o dosis del material TCR administrado debe ser suficiente para producir, p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un período de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material TCR inventivo debe ser suficiente para unirse a NY-ESO-1, o detectar, tratar o prevenir el cáncer en un período de aproximadamente 2 horas o más, p. ej., de 12 a 24 o más horas, desde el tiempo de administración. En determinadas realizaciones, el período de tiempo podría ser incluso mayor. La dosis estará determinada por la eficacia del material de TCR concreto y el estado del animal (p. ej., ser humano), así como el peso corporal del animal (p. ej., ser humano) que se vaya a tratar.
- 50
- 55 Se conocen en la técnica muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Para los fines de la invención, se podría utilizar un ensayo que comprende comparar el grado en que las células diana se lisan o el IFN-γ es secretado por las células T que expresan el TCR, polipéptido o proteína tras la administración de una dosis determinada de dichas células T a un mamífero entre un conjunto de mamíferos de los cuales cada uno recibe una dosis diferente de células T, para determinar una dosis inicial que se administrará a un mamífero. El grado en el que se lisan las células diana o se secreta IFN-γ tras la administración de una determinada dosis se puede analizar mediante métodos conocidos en la técnica, incluidos, p. ej., los métodos descritos en la presente memoria como Ejemplo 3.
- 60 La dosis del material TCR también estará determinada por la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un material de TCR concreto. Normalmente, el médico a cargo decidirá la dosis del material de TCR con el que tratar a cada paciente individual, teniendo en cuenta una variedad de factores, tales como la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el sexo, el material de TCR que se administrará, la vía de administración y la gravedad de la afección que se está tratando. A modo de ejemplo y sin pretender limitar la invención, la dosis del material TCR puede ser de aproximadamente 0,001 a
- 65

aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto que se vaya a tratar/día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal/día.

- 5 Un experto normal en la técnica apreciará fácilmente que los materiales de TCR de la descripción se pueden modificar de diversas formas, de modo que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales de TCR se incrementa mediante la modificación. Por ejemplo, los materiales de TCR de la descripción se pueden conjugar directa o indirectamente a través de un puente a un radical de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, p. ej., materiales de TCR, con radicales de direccionamiento es conocida en la técnica. Véanse, p. ej., 10 Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995) y la Patente de Estados Unidos Núm. 5.087.616. El término "radical de direccionamiento", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce y se une específicamente a un receptor de la superficie celular, de modo que el radical de direccionamiento dirige el suministro de los materiales de TCR a una población de células sobre cuya superficie es expresado el receptor. Los radicales de direccionamiento incluyen, entre otros, anticuerpos o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, 15 factores de crecimiento, citocinas y cualquier otro ligando natural o no natural, que se une a los receptores de la superficie celular (p. ej., Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR), receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), CD28, Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), etc.). El término "puente", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier agente o molécula que une mediante puentes los materiales de TCR al radical de direccionamiento. Un experto en la 20 técnica reconoce que los sitios en los materiales de TCR inventivos, que no son necesarios para la función de los materiales de TCR, son sitios ideales para anclar un puente y/o un resto de direccionamiento, siempre que el puente y/o el radical de direccionamiento, una vez anclado a los materiales de TCR, no interfiera en la función de los materiales de TCR, es decir, la capacidad de unirse a NY-ESO-1 o de detectar, tratar o prevenir el cáncer.
- 25 Alternativamente, los materiales de TCR se pueden modificar en una forma de depósito, de modo que la forma en que se liberan los materiales de TCR en el organismo al que se administra se controla con respecto al tiempo y la ubicación dentro del organismo (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 4.450.150). Las formas de depósito de los materiales de TCR pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales de TCR y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en donde los materiales de TCR están 30 encapsulados o difundidos por todo el material y/o la degradación del material no poroso. A continuación, el depósito se implanta en la ubicación deseada dentro del organismo y los materiales de TCR se liberan del implante a una velocidad predeterminada.
- 35 Se contempla que las composiciones farmacéuticas, los TCR (incluidas las porciones funcionales o variantes de los mismos), los polipéptidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células anfítrionas o las poblaciones de células de la invención puedan utilizarse en métodos para tratar o prevenir el cáncer. Sin estar ligados a una teoría o mecanismo concretos, se cree que los TCR de la invención se unen específicamente 40 a NY-ESO-1, de modo que el TCR (o polipéptido o proteína de la invención relacionados, o porción funcional o variante de los mismos) cuando es expresado por una célula es capaz de mediar una respuesta inmunitaria contra la célula que expresa NY-ESO-1. A este respecto, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas descritos en la presente memoria o cualquier célula anfítriona o población de células que comprendan un vector recombinante que codifique 45 cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.
- 50 Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras derivadas de los mismos, como se emplean en la presente memoria, no implican necesariamente 100% o tratamiento o prevención completos. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención que un experto en la técnica reconoce que tiene un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este respecto, los métodos inventivos pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método descrito en la presente memoria pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, p. ej., cáncer, que está siendo tratado o prevenido. Además, para los 55 propósitos de la presente, "prevención" puede abarcar el retraso de la aparición de la enfermedad, o un síntoma o condición de la misma.
- 60 También se proporciona pero no es parte de la invención un método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero. El método comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende células del cáncer con cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfítrionas, poblaciones de células o anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígenos de los mismos, descritos en la presente memoria, formando así un complejo y detectando el complejo, en donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.
- 65 Con respecto al método de detección del cáncer en un mamífero descrito en la presente memoria, la muestra de células del cáncer puede ser una muestra que comprende células completas, sus productos lisados o una fracción

de los productos lisados de células completas, p. ej., una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción de proteína completa, o una fracción de ácido nucleico.

5 A los efectos del método de detección, el contacto puede tener lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferiblemente, el contacto es *in vitro*.

10 Asimismo, la detección del complejo puede ocurrir a través de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células o anticuerpos, o porciones de unión a antígenos de los mismos, descritos en la presente memoria, se pueden marcar con un marcador detectable tal como, p. ej., un radioisótopo, un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro).

15 Para los fines de los métodos descritos en la presente memoria, en donde se administran células anfitrionas o poblaciones de células, las células pueden ser células alogénicas o autólogas para el mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas para el mamífero.

20 Con respecto a los métodos descritos en la presente memoria, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrectal, cáncer de ojo, cáncer de la vía biliar intrahepática, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de cavidad oral, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, 25 melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de riñón (p. ej., carcinoma de células renales (CCR)), cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, sarcoma de células sinoviales, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. Preferiblemente, el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de 30 tiroides, cáncer de ovario, o sarcoma de células sinoviales.

35 El mamífero al que se hace referencia en los métodos descritos la presente memoria puede ser cualquier mamífero. Como se emplea en la presente memoria, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluidos, entre otros, mamíferos del orden Rodentia, como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Logomorpha, como conejos.

40 45 Se prefiere que los mamíferos sean del orden Carnivora, incluidos Féridos (gatos) y Canidos (perros). Es más preferido que los mamíferos sean del orden Artiodactyla, incluidos los Bóvidos (vacas) y los Suidos (cerdos) o del orden Perisodáctila, incluidos los Équidos (caballos). Lo más preferido es que los mamíferos sean del orden Primates, Ceboideos o Simoides (monos) o del orden Antropoides (humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

#### Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no deben construirse de ninguna manera limitando su alcance.

#### Líneas celulares

50 Se generaron líneas de melanoma 1300mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), 624,38mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), A375mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), 938mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), 888mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), SK23mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), 1359mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), 1359-A2mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), 624mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>) y 1390mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), a partir de lesiones tumorales reseadas y se cultivaron en medio RIO que consistía en RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 10%, L-glutamina de 2 mmoles/l, 50 unidades/ml de penicilina y HEPES de 50 µg/ml (Invitrogen) y 25 mmoles/l (GIBCO, Invitrogen). Otras líneas celulares utilizadas incluyeron: la línea celular de cáncer de cuello uterino Caski (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), (ATCC CRL-1550) la línea celular de osteosarcoma Saos2 (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), (ATCC HTB-85) y la línea celular de neuroblastoma SK NAS-A2 (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), (ATCC CRL-2137), la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas H1299A2 (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), la línea celular de carcinoma de mama MDA-MB-435S-A2 (NY-ESO-1<sup>+</sup>, HLA-A2<sup>+</sup>), (ATCC® HTB-129), de las cuales las tres fueron transducidas con la construcción retroviral para expresar HLA-A \* 0201 (Naviaux et al., J. Virol., 70: 5701-05 (1996), Parkhurst et al., Clin. Cancer Res., 15: 169-180 (2009).), Robbins et al., J. Immunol., 180: 6116-31 (2008), Wargo et al., Cancer Immunol. Immunother., 58: 394 (2009)), COS-A2-ESO, que se transdujo con un vector retroviral que expresaba el gen NY-ESO-1, y COS-A2-CEA, que se transdujo con un vector retroviral que expresaba el gen CEA.

#### EJEMPLO 1

65 66 Este ejemplo demuestra la identificación de clones de células T anti-NY-ESO-1 murinas.

5 Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-A2 con 100 µg de péptido (NY-ESO-1<sub>157-165</sub>) y 120 µg de péptido auxiliar (péptido central del virus de la hepatitis B (HBVc): 128-140) en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (AIF) por vía subcutánea (s.c.) en la base de la cola (50 µg de péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub> en cada uno de los dos lados de la cola), seguido de un refuerzo una semana después con la misma inmunización.

10 10 *Día 0:* Una semana después de la segunda inmunización, se recolectaron y estimularon los esplenocitos *in vitro* con uno de los siguientes: (i) esplenocitos HLA-A2+ activados con LPS (3000 rad) ("blastos LPS") pulsados con 1 µg/ml de péptido de cebado y 10 µg/ml de β2-microglobulina humana o (ii) células T2 (17.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido.

15 15 *Día 7:* Se evaluó la reactividad específica de los cultivos masivos mediante la secreción de IFNy tras el cultivo conjunto con una de las líneas de células tumorales indicadas en la Tabla 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1 (IFN-γ (pg/ml) después de 1 estimulación masiva; "np"= no probado). Debido a que la liberación de citocinas a veces fue muy alta en respuesta a las células T2 cargadas con el péptido del VHB, los valores subrayados para las dianas tumorales indican el doble de los valores de fondo obtenidos con el medio solo y los tumores negativos, y los valores subrayados para los péptidos indican el doble de los valores de fondo obtenidos con T2 y péptido de HBV.

TABLA 1

	<u>HLA-A2</u>	<u>NY-ESO-1</u>	<u>Copias ARN por GAPDH (x100)</u>	<u>Blastos LPS + 1 µg/ml de péptido</u>	<u>T2+ 1 µg/ml de péptido</u>	<u>T2+ 0,1 µg/ml de péptido</u>	<u>T2+ 0,01 µg/ml de péptido</u>
T2+ VHB	+	-	np	41	266	200	71
T2+ ESO:157	+	+	np	549	<u>4505</u>	<u>4.464</u>	<u>406</u>
medios	-	-	np	22	53	69	41
888mel	-	-	0,02	36	133	110	88
Sk23mel	+	-	0,01	24	76	134	17
1359mel	-	+	5,68	55	92	21	26
1359-A2	+	+	np	22	98	73	48
A375mel	+	+	59,08	41	47	143	49
624mel	+	+	4,14	41	73	200	22
1390mel	+	+	np	-	-	-	-
1363mel	+	+	np	-	-	-	-
COS-A2-CEA	+	-	np	32	94	67	56
COS-A2-ESO	+	+	np	33	92	65	61
293-A2-gp100	+	-	np	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	np	-	-	-	-

20 20 *Día 11:* Se clonaron cultivos masivos reactivos de péptido/tumor a 10 células/pocillo en las siguientes condiciones (10 placas por condición): (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido: 5x10<sup>4</sup> células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad): 5x10<sup>4</sup> células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

25 25 *Días 25-30:* Se seleccionaron pocillos con crecimiento positivo y se reestimularon en placas de 48 pocillos bajo las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido: 2x10<sup>5</sup> células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad): 1x10<sup>6</sup> células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

30 30 *Días 37-44:* Se evaluó la reactividad específica de los clones a través de la secreción de IFNy en el cultivo conjunto con las líneas de células tumorales establecidas en la Tabla 2. Las células tumorales se trataron con IFNy (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo.

35 35 Los esplenocitos estimulados con esplenocitos HLA-A2+ activados con LPS (3.000 rad) pulsados con 1 µg/ml de péptido de cebado y 10 µg/ml de β2-microglobulina humana el día 0 produjeron 8 de 960 pocillos con crecimiento positivo. Los datos de los dos clones más reactivos se muestran en la Tabla 2 (estimulación masiva posterior a 1; IFN-γ (pg/ml)).

TABLA 2

	<u>HLA-A2</u>	<u>NY-ESO-1</u>	<u>Copias de ARN por GAPDH (x100)</u>	<u>B</u>	<u>H</u>
T2+ VHB	+	-	np	393	283
T2+ ESO:157	+	+	np	>14.000	>14.000
medios	-	-	np	404	292
888mel	-	-	0,02	386	288

(continuación)

	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	B	H
Sk23mel	+	-	0,01	-	-
1359mel	-	+	5,68	354	285
1359-A2	+	+	np	<u>11.781</u>	<u>16.436</u>
A375mel	+	+	59,08	383	1.954
624mel	+	+	4,14	363	14.298
1390mel	+	+	np	288	<u>17.567</u>
1363mel	+	+	np	<u>3.582</u>	-
COS-A2-CEA	+	-	np	348	289
COS-A2-ESO	+	+	np	<u>&gt;14.000</u>	<u>&gt;14.000</u>
293-A2-gp100	+	-	np	373	274
293-A2-ESO	+	+	np	335	8.813

*Días 46-49:* Los clones de interés se reestimularon en placas de 24 pocillos en las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido:  $5 \times 10^5$  células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad):  $1 \times 10^6$  células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2. Los clones reestimulados se congelaron instantáneamente para la preparación de ARN.

## EJEMPLO 2

5 10 Este ejemplo demuestra la identificación de clones de células T anti-NY-ESO-1 murinas.

10 Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-A2 y se recolectaron, estimularon y evaluaron los esplenocitos para determinar la reactividad específica como se describe en el Ejemplo 1.

15 15 *Día 11:* Los cultivos masivos se reestimularon en placas de 24 pocillos en las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido:  $4 \times 10^5$  células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad):  $1 \times 10^6$  células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

20 20 *Día 19:* Se evaluó la reactividad específica de los cultivos masivos (después de dos estimulaciones) a través de la secreción de IFN-γ en el cultivo conjunto con las líneas de células tumorales que se muestran en la Tabla 3. Las células tumorales se trataron con IFNγ (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 3 (IFN-γ (pg/ml)).

TABLA 3

				Después de 2 estim. masivas.			
	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	blastos LPS +1 µg/ml de péptido	T2+ 1 µg/ml de péptido	T2+ 0,1 µg/ml de péptido	T2+ 0,01 µg/ml de péptido
T2+ VHB	+	-	np	195	2.860	16.156	<u>1.058</u>
T2+ ESO:157	+	+	np	<u>79.524</u>	<u>72.730</u>	<u>47.871</u>	<u>1.899</u>
medios	-	-	np	137	131	156	406
888mel	-	-	0,02	40	201	112	562
Sk23mel	+	-	0,01	79	245	562	424
1359mel	-	+	5,68	73	169	188	357
1359-A2	+	+	np	966	320	1.597	258
A375mel	+	+	59,08	150	176	258	332
624mel	+	+	4,14	320	144	697	301
1390mel	+	+	np	-	-	-	-
1363mel	+	+	np	-	-	-	-
COS-A2-CEA	+	-	np	226	369	400	308
COS-A2-ESO	+	+	np	424	351	326	295
293-A2-gp100	+	-	np	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	np	-	-	-	-

25 25 *Día 21:* Los cultivos masivos se reestimularon en placas de 24 pocillos en las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido:  $5 \times 10^5$  células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad):  $1 \times 10^6$  células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

5 *Día 30:* Se evaluó la reactividad específica de los cultivos masivos (después de tres estimulaciones) a través de la secreción de IFN-γ tras el cultivo conjunto con las líneas de células tumorales que se muestran en la Tabla 4. Las células tumorales se trataron con IFNy (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 4 (IFN-γ (pg/ml); \* indica cultivos masivos que se clonaron después de tres estimulaciones masivas).

TABLA 4

	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	* blastos LPS + 1 µg/ml de péptido	* T2+ 1 µg/ml de péptido	T2+ 0,1 µg/ml de péptido	T2+ 0,01 µg/ml de péptido	TE8 (clon de células I humanas)
T2+ VHB	+	-	np	1.794	4.700	28.797	23.897	16
T2+ ESO:157	+	+	np	<u>78.316</u>	<u>63.793</u>	<u>96.164</u>	19.698	<u>16.254</u>
medios	-	-	np	1.992	389	8.856	10.711	7
888mel	-	-	0,02	1.268	188	6.611	7.614	13
Sk23mel	+	-	0,01	662	202	7.585	6.225	69
1359mel	-	+	5,68	623	64	5.684	7.026	996
1359-A2	+	+	np	<u>27.572</u>	<u>7.774</u>	10.324	7.204	<u>7.936</u>
A375mel	+	+	59,08	1.263	342	7.232	9.425	<u>4.095</u>
624mel	+	+	4,14	<u>14.098</u>	<u>3.211</u>	10.061	8.727	<u>3.262</u>
1390mel	+	+	np	<u>852</u>	179	5.966	6.191	<u>7.123</u>
1363mel	+	+	np	<u>42.970</u>	<u>15.673</u>	<u>20.398</u>	9.958	<u>12.149</u>
COS-A2-CEA	+	-	np	981	119	3.995	6.744	18
COS-A2-ESO	+	+	np	<u>19.523</u>	<u>3.334</u>	9.116	8.187	<u>14.662</u>
293-A2-gp100	+	-	np	-	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	np	-	-	-	-	-

10 *Día 33:* Se clonaron los cultivos masivos reactivos de péptido/tumor seleccionados (después de tres estimulaciones) a 10 células/pocillo como se describe para el Día 11 del Ejemplo 1.

15 *Días 45-48:* Los pocillos con crecimiento positivo se seleccionaron para determinar la reactividad del péptido a través de la secreción de IFN-γ en el cultivo conjunto con las líneas de células tumorales expuestas en la Tabla 5. Las células tumorales se trataron con IFNy (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo.

20 Los esplenocitos estimulados con esplenocitos HLA-A2+ activados con LPS (3000 rad) pulsados con 1 µg/ml de péptido de cebado y 10 µg/ml de β2-microglobulina humana el día 0 produjeron 33 de los 960 pocillos con crecimiento positivo. Los datos para los cuatro clones más reactivos (números 2, 5, 6 y 8) se muestran en la Tabla 5 (después de 3 estimulaciones masivas; IFN-γ (pg/ml)). Los esplenocitos estimulados con células T2 (17.000 rad) pulsados con 1 µg/ml de péptido produjeron 104 de 960 pocillos con crecimiento positivo. Los datos de los cuatro clones más reactivos (números 1, 50, 51 y 63) se muestran en la Tabla 5.

四百九

Días 46-49: Los clones reactivos con péptidos se reestimularon en placas de 24 pocillos como se describe para el día 21 de este ejemplo. Los clones reestimulados se congelaron instantáneamente para la preparación de ARN.

### EJEMPLO 3

- Este ejemplo demuestra el aislamiento de un TCR anti-NY-ESO-1 murino y la reactividad específica del TCR aislado contra NY-ESO-1.
- Se aisló el TCR de cinco clones (a saber, los clones B, H, 5, 6, 1, 50 y 63). La secuencia de nucleótidos (ARN) que codifica el TCR de cada clon se aisló, se secuenció y se transfeció a células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de los pacientes 1 y 2. Las células transfectadas se estimularon con OKT3 e IL-2 y se cultivaron solas (medio) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control (VHB), células T2 pulsadas con péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub>, COA-A2-CEA (NY-ESO-1<sup>+</sup>), COS-A2-ESO (NY-ESO-1<sup>+</sup>), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), Sk23mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), A375mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), 1363mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), 1390 (NY-ESO-1<sup>+</sup>) o 624 (NY-ESO-1<sup>+</sup>). Se midió la secreción de IFN $\gamma$ . Los resultados se muestran en la Tabla 6 (IFN $\gamma$  (pg/ml)).

TABLA 6

	T2+ VHB	T2+ ESO: 157	medios	888	Sk23	1363	1390	A375	624	COS-A2-CEA	COS-A2-ESO
HLA-A2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
NY-ESO-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Paciente 1											
GFP	328	188	B	198	124	226	325	532	32	94	72
AviDex TCR	235	>18,000		7	188	81	>16,000	1837	5752	531	52
TRAV7D-4/TRBV19 <sup>1</sup>	864	>16,000		7	185	102	2282	489	893	38	72
TRAV13D-2/TRBV14 <sup>2</sup>	137	>16,000		8	152	88	134	159	338	28	55
TRAV7D-3/TRBV14 <sup>3</sup>	155	388		7	128	112	122	171	378	28	58
TRAV6D/TRBV26 <sup>4</sup>	158	>16,000		11	255	158	>16,000	3858	5973	782	91
TRAV7D-3/TRBV26 <sup>5</sup>	190	1285		9	208	107	248	188	509	34	78
Paciente 2											
GFP	28	38		2	47	27	22	62	98	3	18
AviDex TCR	50	>16,000		4	32	22	2453	208	192	158	11
TRAV7D-4/TRBV19 <sup>1</sup>	123	>16,000		2	34	15	148	47	39	7	13
TRAV13D-2/TRBV14 <sup>2</sup>	22	7898		9	27	13	28	42	58	11	22
TRAV7D-3/TRBV14 <sup>3</sup>	24	23		11	28	13	21	36	38	5	7
TRAV6D/TRBV26 <sup>4</sup>	53	>16,000		38	77	40	3557	777	344	133	32
TRAV7D-3/TRBV26 <sup>5</sup>	18	77		8	28	17	27	33	51	5	15

<sup>1</sup>TRAV7D-4/TRBV19: Clon ESO (1 estimulación con LPS) B (Tabla 2 anterior)  
<sup>2</sup>TRAV13D-2/TRBV14: Clon ESO (1 estimulación con LPS) H (Tabla 2 anterior)  
<sup>3</sup>TRAV7D-3/TRBV14: Clon ESO (3 estimulaciones con LPS) S (Tabla 5 anterior)  
<sup>4</sup>TRAV6D/TRBV26: Clones ESO (3 estimulaciones con LPS) S; ESO (3 estimulaciones T2) 1; ESO (3 estimulación T2) 83 (Tabla 5 anterior)  
<sup>5</sup>TRAV7D-3/TRBV26: Clon ESO (3 estimulaciones con T2) 50 (Tabla 5 anterior)

- Como se muestra en la Tabla 6, el TCR TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12) proporcionó la reactividad anti-NY-ESO-1 específica más alta y se eligió para un estudio adicional.
- La secuencia de nucleótidos (ARN) que codifica el TCR TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12) se transfeció a PBMC humanas de los pacientes 3 y 4. Las células transfectadas se seleccionaron positivamente para las células CD8+ y CD4+, se estimularon con OKT3 e IL-2, y se cultivaron solas (medio) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control (VHB), células T2 pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub>, COS-A2-ESO (NY-ESO-1<sup>+</sup>), COA-A2-CEA (NY-ESO-1<sup>+</sup>), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), Sk23mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), A375mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), 1363mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>) o 624 (NY-ESO-1<sup>+</sup>). Se midió la secreción de IFN $\gamma$  y los resultados se muestran en la Tabla 7 (IFN $\gamma$  (pg/ml)).

TABLA 7

T2+ VH8		-T2+ E SO: 157-165-				883		SK23		A375		624		1363		CO5-42		CO5-42			
CD8+	10 <sup>-2</sup> g/ml	10 <sup>-11</sup> g/ml	10 <sup>-10</sup> g/ml	10 <sup>-9</sup> g/ml	10 <sup>-8</sup> g/ml	10 <sup>-7</sup> g/ml	10 <sup>-6</sup> g/ml	10 <sup>-5</sup> g/ml	10 <sup>-4</sup> g/ml	10 <sup>-3</sup> g/ml	10 <sup>-2</sup> g/ml	10 <sup>-1</sup> g/ml	10 <sup>-0</sup> g/ml	10 <sup>+1</sup> g/ml	10 <sup>+2</sup> g/ml	A2+	A2+	A2+	A2+	CEA	ESO
Patient 3																					
CD8+	TRAV6/1TRBV26	243	236	1075	4257	8170	3398	5087	8142	122	90	70	412	125	1194	56	1041				
	GFP	88	47	27	28	9	17	18	25	12	19	5	18	1	27	11	20				
Patient 4																					
CD4+	TRAV6/1TRBV26	127	67	68	1596	12835	19181	12495	14641	173	56	43	250	84	261	30	170				
	Antibex	8	0	1	40	1147	2455	3538	5782	17	0	0	25	3	26	10	14				
	GFP	10	0	0	0	0	0	0	0	10	5	0	43	18	47	4	7				
Patient 5																					
CD8+	TRAV6/1TRBV26	15	55	331	1713	2670	3721	2858	2878	0	0	0	48	15	262	0	380				
	GFP	42	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	2	0				
Patient 6																					
CD4+	TRAV6/1TRBV26	38	1	58	5774	18051	18681	>24000	>20000	21	7	0	192	38	476	2	241				
	Antibex	25	0	0	200	2922	15574	>34000	18283	8	0	0	37	0	60	0	23				
	GFP	12	0	0	0	0	0	10	30	0	0	0	28	14	42	0	0				

Como se muestra en la Tabla 7, las células transfectadas con TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12) TCR reconocieron específicamente las células tumorales de melanoma NY-ESO-1+, según se midió mediante la secreción de IFNy.

5 EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células T CD8+ y CD4+ humanas transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con péptido NY-ESO-1.

10 Se transfectaron células T humanas CD8+ (Figura 1A) o CD4+ (Figura 1B) con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) o un TCR anti-NY-ESO-1. Las células transfectadas se cultivaron conjuntamente con células dendríticas pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub> y se midió la secreción de IFNy.

15 Como se muestra en las Figuras 1A y 1B, las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) fueron reactivas contra las células dendríticas pulsadas con péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub>, según se midió por la secreción de IFNy. Las células T humanas CD8+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) fueron más reactivas contra las células dendríticas pulsadas con péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub>, según se midió por la secreción de IFNy, en comparación con las

20 células CD8+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 humano.

EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino tras el cultivo conjunto con células tumorales de melanoma.

25 Se transfectaron células T humanas CD8+ (Figura 2A) o CD4+ (Figura 2B) con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) o un anti-NY-ESO-1 humano. 1 TCR. Las células transfectadas se cultivaron solas (medio) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control, células T2 pulsadas con NY-ESO-1<sub>157-165</sub> péptido, COA-A2-CEA (NY-ESO-1<sup>+</sup>), COS-A2-ESO (NY-ESO-1<sup>+</sup>), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), Sk23mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), A375mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), o 1363mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>). Se midió la secreción de IFNy.

30 Como se muestra en las Figuras 2A y 2B, las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) reconocieron específicamente el tumor de melanoma NY-ESO-1+ células, medido por la secreción de IFNy. Los linfocitos T humanos CD8+ y CD4+ transfectados con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) fueron más reactivos contra las líneas de células tumorales NY-ESO-1+, según lo medido por IFNy secreción, en comparación con las células CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 humano.

40 EJEMPLO 6

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células T CD8+ y CD4+ humanas transfectadas con una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje o con codones optimizados que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino tras el cultivo conjunto con células tumorales de melanoma.

45 Se transfeció una secuencia de nucleótidos (ARN) de tipo salvaje (SEQ ID NO: 19 y 20) o con codones optimizados (SEQ ID NO: 15 y 16) que codificaba el TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) a PBMC humanas CD8+ o CD4+ de los pacientes 5 y 6. Las células transfectadas se seleccionaron positivamente para las células CD8+ y CD4+, se estimularon con OKT3 e IL-2, y se cultivaron solas (medio) o cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control (HBVc), células T2 pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub>, COA-A2-CEA (NY-ESO-1<sup>+</sup>), COS-A2-ESO (NY-ESO-1<sup>+</sup>), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), Sk23mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), A375mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), 1363mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>), A375 (NY-ESO-1<sup>+</sup>), o 624mel (NY-ESO-1<sup>+</sup>). Se midió la secreción de IFNy. Los resultados se muestran en la Tabla 8 (IFNy (pg/ml)).

TABLA 8

	Paciente 5 CD4				Paciente 5 CD8				Paciente 6 CD4				Paciente 6 CD8				
	Cobijo estimado	Tipo salvaje	GFP	Cobijo estimado	Tipo salvaje	GFP	Cobijo estimado	GFP	Cobijo estimado	Tipo salvaje	GFP	Cobijo estimado	Tipo salvaje	GFP	Cobijo estimado	Tipo salvaje	GFP
medios	10.3	62	0	43	60	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
72+ HBc	58	37	4	71	108	82	2	17	7	3	12	8	6	6	12	8	6
72+ 10 <sup>4</sup> M ESO	44	32	0	67	86	46	13	15	6	6	9	14	6	6	14	9	6
72+ 10 <sup>4</sup> M ESO	83	42	0	52	150	30	15	22	7	20	23	2	2	2	23	2	2
72+ 10 <sup>4</sup> M ESO	69	27	3	221	175	43	13	18	4	122	176	0	0	0	176	0	0
72+ 10 <sup>4</sup> M ESO	232	60	0	3142	2465	30	738	555	6	1978	2056	4	4	4	2056	4	4
72+ 10 <sup>4</sup> M ESO	5158	2979	0	12308	13394	58	15458	12906	7	5382	11217	0	0	0	11217	0	0
72+ 10 <sup>4</sup> M ESO	13987	9362	1	>20000	>20000	37	23381	21321	6	8914	13127	0	0	0	13127	0	0
72+ 10 <sup>4</sup> M ESO	15345	9417	0	>20000	>20000	51	26382	25225	6	14734	19766	2	2	2	19766	2	2
683mel (42-ESO-)	54	30	8	55	98	37	22	8	8	38	58	37	17	17	58	37	17
Sk23mel (42+ ESO-)	30	34	7	8	26	28	3	0	3	8	25	11	0	0	11	0	0
A375 (42+ ESO+)	238	204	75	525	325	55	114	146	62	186	480	22	0	0	480	22	0
824mel (42+ ESO+)	192	81	57	178	211	24	44	42	8	32	125	0	0	0	125	0	0

(continuación)

	Paciente 5 CD4				Paciente 5 CD8				Paciente 6 CD4				Paciente 6 CD8			
	Cobertura Determinante	Tipo Salvaje	GFP	Cobertura optimizada	Cobertura Determinante	Tipo Salvaje	GFP	Cobertura Determinante	Cobertura Determinante	Tipo Salvaje	GFP	Cobertura optimizada	Cobertura Determinante	Tipo Salvaje	GFP	Médios
1363m 84 (A2+ E SO+)	<u>895</u>	<u>443</u>	178	<u>364</u>	<u>1421</u>	28	<u>525</u>	<u>578</u>	153	<u>476</u>	<u>1072</u>	26	<u>119</u>	<u>119</u>	119	119
CDS-A2-CEA	88	88	22	51	83	39	8	17	16	4	13	9	4	4	4	4
CDS-A2-ESO	419	92	2	1322	1436	22	1213	431	17	872	1372	16	6	6	6	6

Como se muestra en la Tabla 8, las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje o de codón optimizado que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) reconocieron específicamente las células de tumor de melanoma NY-ESO-1+, medido por la secreción de IFNy.

5 EJEMPLO 7

Este ejemplo demuestra la reactividad de células T CD8+ humanas transfectadas con una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino tras el cultivo conjunto con células tumorales de melanoma y que no son de melanoma.

10 Se sometió a electroporación una secuencia de nucleótidos (ARN) (SEQ ID NO: 19 y 20) que codifica el TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) a células T humanas CD8+ de los pacientes 7 y 8. Las células no transfectadas (simulación) o las células transfectadas se seleccionaron positivamente para las células T CD8+, se estimularon con OKT3 e IL-2, y se cultivaron solas (medio) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control (HBVc); células T2 pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-<sub>1157-165</sub>; COA-A2-CEA (NY-ESO-1); COS-A2-ESO (NY-ESO-1+); una de varias líneas celulares de tumor de melanoma 888mel (NY-ESO-1+), Sk23mel (NY-ESO-1+), A375mel (NY-ESO-1+), 1363mel (NY-ESO-1+), A375 (NY-ESO-1+); línea celular de sarcoma osteogénico Saos2 (NY-ESO-1+); línea celular de glioma LN-18 (NY-ESO-1+); línea celular de sarcoma de Ewing TC-71 (NY-ESO-1+); líneas celulares de neuroblastoma SKN AS (NY-ESO-1+) o SKN AS-A2 (NY-ESO-1+); o líneas celulares de cáncer de mama MDA 453S (NY-ESO-1+) o MDA 453S-A2 (NY-ESO-1+). Se midió la secreción de IPNy. Los resultados se muestran en la Tabla 9 (IPNy (pg/ml)).

TABLA 9

		--Paciente 7 CD8 --		--Paciente 8 CD8 --		
		<u>ESO a/b</u>	<u>simulación</u>	<u>ESO a/b</u>	<u>simulación</u>	<u>medios</u>
medios		21	0	0	6	0
T2+ HBVc		64	60	88	50	0
T2+ 10-12 M ESO		50	58	107	59	0
T2+ 10-11 M ESO		66	51	<u>209</u>	71	0
T2+ 10-10 M ESO		<u>332</u>	66	<u>1704</u>	50	0
T2+ 10-9 M ESO		<u>3142</u>	51	<u>10886</u>	55	0
T2+ 10-8 M ESO		<u>6505</u>	52	<u>&gt;20000</u>	58	0
T2+ 10-7 M ESO		<u>6764</u>	42	<u>&gt;20000</u>	51	0
T2+ 10-6 M ESO		<u>6550</u>	55	<u>&gt;20000</u>	58	0
888mel (A2-ESO -)	melanoma	59	45	142	133	0
Sk23mel (A2+ ESO-)	melanoma	79	54	31	59	0
A375mel (A2+ ESO+)	melanoma	<u>2986</u>	240	<u>1984</u>	93	0
1363mel (A2+ ESO+)	melanoma	<u>1889</u>	119	<u>9858</u>	137	0
Saos2 (A2+ ESO+)	sarcoma osteogénico	<u>248</u>	34	<u>1253</u>	28	0
LN-18 (A2+ ESO+)	glioma	123	21	224	34	0
TC-71 (A2+ ESO+)	sarcoma de Ewing	<u>159</u>	116	183	127	3
SKN AS (A2-ESO+)	neuroblastoma	542	328	199	207	2
SKN AS - A2 (A2+ ESO+)	neuroblastoma	148	38	<u>1004</u>	39	0
MDA 453S (A2-ESO+)	cáncer de mama	448	311	177	230	0
MDA 453S -A2 (A2+ ESO+)	cáncer de mama	111	50	<u>610</u>	39	0
COS-A2-CEA (A2+ ESO-)		45	51	50	63	7
COS-A2-ESO (A2+ ESO+)		<u>588</u>	34	<u>4109</u>	63	0

25 Como se muestra en la Tabla 9, las células T humanas CD8+ transfectadas con una secuencia de nucleótidos que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) reconocieron específicamente el melanoma NY-ESO-1+, el sarcoma osteogénico, el sarcoma de Ewing, el neuroblastoma y células tumorales de cáncer de mama, medidas por la secreción de IFNy.

30 EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra la preparación de vectores de expresión recombinantes que codifican un TCR anti-NY-ESO-1 murino.

35 Un vector retroviral que comprendía ADN que codificaba TCR anti-NY-ESO-1 humano de tipo salvaje (1G4), TCR 1G4 que tenía una doble sustitución dentro de la cadena CDR3 $\alpha$  en la que leucina y tirosina se sustituían por

treonina en la posición 95 (1G4-LY) (Robbins et al., J. Clin. Oncol., 29: 917-924 (2011); Robbins et al., J. Immunol., 180: 6116-6131 (2008)), o TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) (SEQ ID NO: 11 y 12) se clonaron en un esqueleto retroviral MSGVI y se transformaron en células TOP10. Un péptido de picornavirus 2A (SEQ ID NO: 13) conectó las cadenas alfa y beta. Se prepararon dos vectores que codificaban el TCR TRAV6D/TRBV26 murino: uno contenía la secuencia de nucleótidos que codificaba la cadena alfa ubicada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codificaba la cadena beta (mESO $\alpha\beta$ ) (SEQ ID NO: 17), y uno contenía la secuencia de nucleótidos que codificaba la cadena beta ubicada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codificaba la cadena alfa (mESO $\beta\alpha$ ) (SEQ ID NO: 18). La presencia de los insertos que codificaban las cadenas alfa y beta del TCR se confirmó mediante digestión con las enzimas de restricción *Nco* I y *Not* I. Se generó ADN a partir de un clon para cada uno de los TCR humanos y murinos mediante maxiprep.

El ADN de los vectores 1G4 TCR y 1G4-LY se transfeció a células 293GP para recoger el sobrenadante y transducir PBL en experimentos de transducción posteriores. Como control se utilizó un vector que codificaba GFP.

#### 15 EJEMPLO 9

Este ejemplo demuestra la eficacia de transducción de un TCR anti-NY-ESO-1 murino.

20 Se estimularon linfocitos de sangre periférica (PBL) con OKT3 el día 0 (S1). Los PBL se transdijeron con el vector de TCR 1G4, 1G4-LY, mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  del Ejemplo 8 los Días 3 y 4. Los Días 7-11, se evaluó la eficacia de transducción mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Para la FACS se utilizaron un anticuerpo que reconocía la región variable del TCR murino (VB13.1) y un anticuerpo que reconocía la región constante del TCR murino (mB). La FACS se realizó de 7 a 11 días después de la primera estimulación (S1D7-S1D11). Los resultados se resumen en la Tabla 10 a continuación.

25

TABLA 10

	% VB13.1, células mB+ pre-expansión rápida (REP) (para 5 donantes) (S1D7-S1D11)
No transducido (UT)	0-6
Proteína verde fluorescente (GFP)	67-90,5
1G4 TCR	62-85
TCR 1G4-LY	37-85
mESO $\alpha\beta$ TCR	56-90
mESO $\beta\alpha$ TCR	56-91

Como se muestra en la Tabla 10, los PBL transducidos con el vector de TCR mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  se transdijeron con una eficacia similar en comparación con los vectores que codificaban los TCR 1G4 y 1G4-LY.

30

#### EJEMPLO 10

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células transducidas con un vector que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino.

35 Se estimularon PBL de cinco donantes y no se transdijeron o se transdijeron con vectores que codificaban GFP o los TCR 1G4-LY, mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  como se describe en el Ejemplo 9. Se cultivaron conjuntamente PBL transducidos con una de las diversas líneas de células tumorales enumeradas en la Tabla 11A o 11B más abajo o con células T2 pulsadas con péptido SSX, sin péptido (T2) o una de las diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub> enumeradas en la Tabla 12 a continuación. La secreción de IFNy se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) del sobrenadante de 24 horas de los cultivos conjuntos. El ELISA se realizó 6, 7 o 10 días después de la primera estimulación (S1D6, S1D7 y S1D10). Los resultados se muestran en las Tablas 11A, 11B y 12 (IFNy pg/ml). La eficacia de la transducción (Td) se basó en el análisis FACS de células V $\beta$ 13.1+ m $\beta$ +

40

45

TABLA 11A

		Patiente 1 (Dilución 1:10; S1D7)				Patiente 2 (Dilución 1:5; S1D7)				Patiente 3 (Dilución 1:5; S1D10)			
		% eficacia td		888	938	COSA2-2p100		624.38	H1299-A2	A375	CoAS-A2-ESO	1300	
No transducido (UT)	N/A	12	0	99		22		17	132		24		61
GFP	90	0	0	91		17		65	95		0		33
TCR 1G4-LY	85	12	0	92		3316		2592	3059		1391		5732
mesoCap TCR	83	239	284	156		5522		3616	4430		1612		6922
mesoCap TCR	83	329	326	42		6721		2898	4176		2270		7798
		Patiente 2 (Dilución 1:5; S1D7)				Patiente 3 (Dilución 1:5; S1D10)							
No transducido (UT)	N/A	44	43	46		44		42	53		46		42
GFP	67	42	42	43		44		40	50		41		41
TCR 1G4-LY	63	53	43	44		346		1446	454		132		352
mesoCap TCR	56	43	44	45		372		1258	415		108		323
mesoCap TCR	56	43	46	45		327		1236	412		136		625

TABLA 1tB

Paciente 4 (Dilución 1:5; S1D6)							
No transducido (UT)	% Td eficacia	Medios	888	938	COS-A2 gp1100	624,38	H1239-A2
No transducido (UT)	N/A	52	155	35	294	195	122
GFP	91%	34	91	22	78	105	62
TCR 1G4LY	75%	86	113	54	313	2172	7187
mESO $\alpha$ TCR	64%	41	131	98	185	1946	5744
mESO $\beta$ TCR	85%	52	130	110	164	2812	7153

Paciente 5 (Dilución 1:5; S1D6)							
No transducido (UT)	% Td eficacia	Medios	23	12	88	9	8
No transducido (UT)	N/A	42	23	12	88	9	8
GFP	87%	15	20	15	76	0	11
TCR 1G4LY	25%	63	16	10	20	1172	3156
mESO $\alpha$ TCR	74%	19	55	22	57	444	917
mESO $\beta$ TCR	74%	15	32	20	24	810	2417

TABLA 12

No transducido (UT)	% eficacia id	SSX	T2	1 $\mu$ g/ml	Patient 1 (Dilución 1:5; S1D7)			0,1 mg/ml
					100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml	
<b>Patient 1 (Dilución 1:5; S1D7)</b>								
GFP	90	0	0	0	0	0	0	0
1G4 TCR	85	0	0	2452	2475	1525	851	99
TCR 1G4-LY	85	0	0	2173	1599	1087	677	0
mESO $\alpha$ TCR	83	0	0	2825	2210	1904	1060	278
mESO $\beta$ TCR	83	0	0	3018	2403	2020	1212	522
<b>Patient 2 (Dilución 1:5; S1D7)</b>								
No transducido (UT)	N/A	22	20	52	24	21	33	53
GFP	67	17	38	33	39	31	24	20
1G4 TCR	62	19	15	1963	1104	860	397	41
TCR 1G4-LY	63	15	19	2441	1280	879	291	40
mESO $\alpha$ TCR	56	20	42	4645	1854	1529	535	92
mESO $\beta$ TCR	56	38	27	7091	2302	1336	348	262

Las células transducidas con los vectores mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  TCR reconocieron específicamente las líneas de células tumorales diana NY-ESO-1 $^+$ /HLA-A $^0$ 201 $^+$  pero no las líneas celulares HLA-A $^0$ 201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$  o HLA-A $^0$ 201 $^+$ /NY-ESO-1 $^-$  según se midió por la secreción de IFNy (Tablas 11A y 11B). Las células transducidas con los vectores de TCR mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  reconocieron específicamente las células T2 pulsadas con el péptido NY-ESO-1 según se midió por la secreción de IFNy (Tabla 12). El reconocimiento específico de NY-ESO-1 fue uniforme entre las células de cinco donantes diferentes. La funcionalidad de las células transducidas con el TCR anti-NY-ESO-1 murino fue comparable a la de las células transducidas con el TCR anti-NY-ESO-1 humano. La funcionalidad de las células transducidas con el vector de TCR mESO $\beta\alpha$  fue ligeramente superior en comparación con la de las células transducidas con el vector de TCR mESO $\alpha\beta$ . Los PBL transducidos con los vectores de TCR mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  reconocieron las células T2 pulsadas con tan solo 1 ng/ml, lo que indica que ambos mTCR son receptores de avidez relativamente alta. El cultivo conjunto de PBL que expresaban los vectores de TCR mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  con células T2 de control que no fueron pulsadas con ningún péptido produjo niveles de fondo de IFN- $\gamma$ . Las células del Paciente 1 transducidas con el TCR mESO $\beta\alpha$  tenían niveles más altos de secreción de IFN- $\gamma$  en comparación con las células transducidas con el TCR mESO $\alpha\beta$  para el mismo nivel de péptido. Las células del paciente 2 transducidas con el TCR mESO $\beta\alpha$  tenían niveles más altos de secreción de IFN- $\gamma$  en comparación con las células transducidas con el TCR mESO $\alpha\beta$  para el mismo nivel de péptido para concentraciones de péptido de 1  $\mu$ g/ml, 100 ng/ml y 0,1 ng/ml.

#### EJEMPLO 11

Este ejemplo demuestra que las células transducidas con un vector que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino mantienen la expresión del TCR anti-NY-ESO-1 murino después de la expansión del número de células.

Los PBL de dos donantes se estimularon y no se transdijeron o se transdijeron con vectores que codificaban GFP o los TCR 1G4, 1G4-LY, mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  como se describe en el Ejemplo 9. El número de PBL se expandió como describen Riddell et al., en *Science*, 257:238-241 (1992) y Dudley et al., en *Cancer J. Sci. Am.*, 6:69-77 (2000). Generalmente, el número de PBL se expandió hasta 3 log utilizando OKT3 soluble, células alimentadoras irradiadas e IL-2 a dosis altas. La expresión de TCR anti-NY-ESO-1 murino mediante números expandidos (expandidos una vez) de células se midió mediante FACS dos veces (los días 10 y 20). Los resultados se resumen en la Tabla 13 (% VB13.1, células mB+ después de la expansión).

TABLA 13

Donante	1		2	
	D10	D20	D10	D20
UT	0	<1	0	<1
GFP	88	87	42	70
1G4 TCR	59	80	50	59
TCR 1G4-LY	76	88	37	60
mESO $\alpha\beta$ TCR	82	76	62	46
mESO $\beta\alpha$ TCR	82	74	62	50

Como se muestra en la Tabla 13, el PBL transducido con el vector de TCR mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  mantuvo la expresión del TCR anti-NY-ESO-1 murino después de la expansión del número de células.

#### EJEMPLO 12

Este ejemplo demuestra que las células transducidas con un vector que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino mantienen la funcionalidad después de la expansión del número de células transducidas.

Se estimularon PBL de dos donantes y no se transdijeron o se transdijeron con vectores que codificaban GFP o los TCR 1G4-LY, mESO $\alpha\beta$  o mESO $\beta\alpha$  como se describe en el Ejemplo 9. El número de células transducidas se expandió como se describe en el Ejemplo 11. Se cultivaron PBL expandidos transducidos solos (medio) o se cultivaron conjuntamente con una de las diversas líneas de células tumorales enumeradas en la Tabla 14 a continuación o con células T2 pulsadas con péptido SSX, sin péptido (T2) o una de las diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1<sub>157-165</sub> enumeradas en la Tabla 15 a continuación. La secreción de IFNy se midió mediante ELISA nueve días después de la segunda estimulación (S2D9). Los resultados se muestran en las Tablas 14 y 15 (IFNy pg/ml; Dilución 1:10).

TABLA 14

	% eficacia tcf	Medios	888	938	COS-A2-9P100	624-36	H1298-A2	A375	COAS-A2-ESO	1300
Paciente 1										
Paciente 2										
No transducido (UT)	N/A	282	181	91	515	78	128	779	-	91
GFP	88	95	87	44	216	44	48	783	-	53
TCR 1G41Y	76	208	184	105	260	<u>2233</u>	<u>12848</u>	<u>6454</u>	-	<u>2786</u>
mesoCp TCR	82	129	183	131	121	<u>2132</u>	<u>11976</u>	<u>6152</u>	-	<u>3035</u>
mesoCa TCR	82	92	194	130	146	<u>9104</u>	<u>11381</u>	<u>6226</u>	-	<u>2654</u>

TABLA 15

	% eficacia id	SSX	T2	1 $\mu$ g/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml	0.1 ng/ml
Paciente 1								
Paciente 2								
No transducido (UT)	NA	365	479	123	113	168	168	231
GFP	88	0	30	0	0	0	0	0
1G4 TCR	59	479	275	26446	13424	13530	6988	1277
TCR 1G4-LY	76	185	217	30639	21532	16246	7261	1328
mESOαβ TCR	82	511	516	26427	22062	16950	3601	1673
mESOαγ TCR	82	399	384	27813	23052	16872	3076	2174
No transducido (UT)	NA	376	1281	886	816	680	782	764
GFP	42	660	912	505	697	725	591	763
1G4 TCR	50	279	364	19505	12698	7350	3553	747
TCR 1G4-LY	37	150	110	19416	10632	6799	2495	662
mESOαβ TCR	62	386	460	19960	13887	9970	4488	1025
mESOαγ TCR	62	379	611	16434	12708	9646	5266	1177

La funcionalidad de las células transducidas expandidas también se evaluó mediante un ensayo de liberación de cromo. Las células transducidas expandidas (células efectoras) se cultivaron conjuntamente con células de melanoma diana, células 624,38 (Tabla 16A) o células A375 (Tabla 16B) en diversas proporciones de células efectoras: diana (E:T) y se midió el porcentaje de células diana lisadas. Los resultados se muestran en las Tablas 16A y 16B (porcentaje de células diana lisadas).

TABLA 16A

Razón E:T	TCR 1G4-LY	mESO $\alpha/\beta$ TCR	mESO $\beta/\alpha$ TCR	GFP
40 : 1	71,0	69,0	68	20,0
13 : 1	59,0	64,0	62	13,0
4 : 1	54,0	73,0	46	23,0
1,5 : 1	42,0	40,0	39	2,0

TABLA 16B

Razón E:T	IG4-LY TCR	mESO $\alpha/\beta$	mESO $\beta/\alpha$	GFP
40 : 1	43,0	49,0	51	21,0
13 : 1	43,0	47,0	50	16,0
4 : 1	36,0	28,0	32	8,0
1,5 : 1	29,0	31,0	32	6,0

Como se muestra en las Tablas 14, 15, 16A y 16B, las células transducidas con un vector que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino mantuvieron la funcionalidad después de la expansión del número de células transducidas.

## EJEMPLO 13

Este ejemplo demuestra un método de producción de clones de células de empaquetamiento para la producción de TCR mESO $\beta/\alpha$  para una posible aplicación clínica.

Se utilizó ADN para el vector de TCR mESO $\beta/\alpha$  para producir clones de células de empaquetamiento de vector retroviral en las condiciones requeridas para una posible aplicación clínica. Se utilizó sobrenadante de seis clones de células productoras de PG13 para transducir PBL. El análisis FACS de los PBL transducidos utilizando el anticuerpo anti-cadena  $\beta$  de TCR de ratón reveló que cada clon producía virus que mediaba la transducción de TCR positiva (Tabla 17). Para evaluar el reconocimiento específico de las células tumorales, los PBL modificados genéticamente con mTCR de cada clon de células productoras de PG13 se cultivaron conjuntamente con un panel de líneas celulares derivadas de melanoma y tumor de pulmón HLA-A\*0201 $^+$  y HLA-A\*0201 $^+$  (Tabla 17). El IFN-gamma se midió mediante ELISA. Una comparación de los seis clones productores de mTCR PG13 mostró que las células T transducidas con el clon C1 liberaron altos niveles de IFN- $\gamma$  en respuesta a HLA-A\*0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$  la célula tumoral se dirigió a H1299-A2 y demostró la mayor eficacia de transducción (Tabla 17). Estas respuestas fueron específicas ya que se liberaron niveles de fondo de IFN- $\gamma$  en respuesta a las líneas celulares NY-ESO-1 $^+$ /HLA-A\*0201 $^+$  y a las líneas celulares NY-ESO-1 $^+$ /HLA-A\*0201 $^+$  por cada clon (Figura 2). Basándose en este análisis, se seleccionó el clon C1 para la producción de un banco de células maestras para la posterior producción de sobrenadante retroviral de buenas prácticas de fabricación (BPF).

TABLA 17

Clon	% mTCR $\beta$	IFN- $\gamma$ pg/ml				
		medios	888	H1299A2	624.38	A375
UT	4	122	1	0	0	146
B2	30	39	46	2923	670	382
C1	63	0	0	7529	942	257
C12	42	10	0	3332	661	351
D8	36	64	90	5773	675	439
F2	47	31	38	5533	579	488
H4	44	34	38	7185	531	459

## EJEMPLO 14

Este ejemplo demuestra la eficacia de transducción de células transducidas con un TCR mESO $\beta/\alpha$  utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células empaquetadoras del Ejemplo 13.

Para comparar los respectivos TCR NY-ESO-1 (murino, o mTCR, versus humano, o hTCR (1G4-LY TCR)), se realizó un análisis FACS de PBL transducidos con sobrenadante retroviral de clones de células empaquetadoras utilizando los anticuerpos anti-cadena  $\beta$  de TCR de ratón y los anticuerpos anti-V $\beta$ 13.1 después de una estimulación con OKT3 y después de una segunda expansión a gran escala utilizando el protocolo de expansión rápida (REP) (Tabla 18). Los resultados demostraron que tanto el mTCR como el hTCR tenían porcentajes equivalentes de transducción después de la estimulación, teniendo el mTCR niveles de transducción iguales o

mayores después de REP (Tabla 18).

TABLA 18

	% TCR			
	Donante H		Donante E	
	Después de una estimulación con OKT3	Después de expandir el número de células dos veces	Después de una estimulación con OKT3	Después de expandir el número de células dos veces
UT	4	13	4	8
TCR 1G4-LY	52	56	48	44
mESO $\beta$ TCR	56	61	46	66

## 5 EJEMPLO 15

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células transducidas con un TCR mESO $\beta$  utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células empaquetadoras del Ejemplo 13.

- 10 El reconocimiento de cada TCR se evaluó sometiendo las células T transducidas con mTCR y hTCR a cultivo conjunto con células T2 pulsadas con péptido NY-ESO-1. Tanto el mTCR como el hTCR secretaron específicamente IFN- $\gamma$  al encontrarse con el péptido antigenólico de una manera dependiente de la dosis después de una estimulación con OKT3 y después de REP (Tabla 19). Después de una estimulación, tanto el mTCR como el hTCR reconocieron las células T2 pulsadas con tan solo 0,1 ng/ml, lo que indica que ambos mTCR son receptores de avidez relativamente alta. Después de la expansión del número de células, el mTCR liberó niveles más altos de IFN- $\gamma$  en comparación con las células T transducidas con el vector hTCR a cada concentración de péptido (Tabla 19). El cultivo conjunto de PBL que expresaban mTCR contra NY-ESO-1 o Htcr contra NY-ESO-1 con células de control T2 que no fueron pulsadas con ningún péptido produjo niveles de fondo de IFN- $\gamma$ .
- 15

20

TABLA 19

Concentración de péptidos	IFN- $\gamma$ pg/ml Donante H (después de estimulación con OKT3)				
	Células T2 sin péptido	0,1 ng/ $\mu$ l	1 ng/ $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l
UT	400	380	329	350	285
GFP	633	455	424	410	412
TCR 1G4-LY	1259	1400	1710	3016	3775
mESO $\beta$ TCR	1070	1316	1660	3091	3744
IFN- $\gamma$ pg/ml Donante H (después de expandir el número de células)					
Concentración de péptidos	Células T2 sin péptido	0,1 ng/ $\mu$ l	1 ng/ $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l	100 ng/ $\mu$ l
UT	34	47	57	22	28
GFP	34	47	57	22	28
TCR 1G4-LY	24	89	512	2974	4341
mESO $\beta$ TCR	174	229	1456	6633	10683

25 Para evaluar el reconocimiento específico de las células tumorales, los PBL modificados genéticamente con mTCR se cultivaron conjuntamente con un panel de líneas celulares derivadas de melanoma y tumor de pulmón HLA-A\*0201 $^+$  y HLA-A\*0201 $^-$ . Se observó una liberación específica de IFN- $\gamma$  cuando tanto el PBL modificado genéticamente con mTCR como el hTCR se cultivaron conjuntamente con líneas celulares HLA-A\*0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$  pero no líneas celulares HLA-A\*0201 $^-$ /NY-ESO-1 $^+$  o HLA-A\*0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^-$  (Tabla 20 (se muestran experimentos representativos)).

TABLA 20

		Paciente H							
		H1299-A2		624.38		1300		938	
No transducido (UT)		86		93		118		0	
GFP		83		81		91		0	
TCR 1G4-LY		14549		6171		1507		0	
mESO $\beta$ α TCR		8877		4248		1326		0	
		Paciente E							
		H1299-A2		624.38		1300		938	
No transducido (UT)		64		72		81		0	
GFP		70		72		63		0	
TCR 1G4-LY		7483		2149		452		0	
mESO $\beta$ α TCR		10646		3548		986		0	

## EJEMPLO 16

Este ejemplo demuestra la lisis específica de células de melanoma por células transducidas con un TCR mESO $\beta$  utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células de empaquetamiento del Ejemplo 13.

5 También se comparó la lisis específica de líneas celulares de melanoma por el mTCR y el hTCR. La capacidad del PBL transducido para lisis las células tumorales HLA-A\*0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$  se midió utilizando un ensayo de bioluminiscencia CYTOTOX-GLO (Promega, Madison, WI). Este ensayo utiliza un sustrato peptídico luminogénico, el sustrato AAF-GLO, para medir la actividad de la proteasa de células muertas, que se libera de las células que han perdido la integridad de la membrana, lo que genera una señal luminiscente de "tipo resplandor" que es proporcional al número de células muertas en la muestra. El sustrato AAF-GLO no puede atravesar la membrana intacta de las células vivas y no genera ninguna señal apreciable de la población de células vivas. En estos ensayos, los PBL modificados con TCR se incubaron conjuntamente con proporciones crecientes de células diana (E:T) en medio AIM-V en placas de 96 pocillos con fondo en U a 37°C durante 4 horas (h). La lisis se midió mediante liberación de bioluminiscencia en el medio: porcentaje de lisis específica = [liberación específica - (liberación espontánea del efecto + liberación espontánea de la diana)]/liberación total de la diana - liberación espontánea de la diana x 100%, promedio de muestras cuadriplicadas. Se mide poca o ninguna lisis celular como valor negativo.

10 20 Como se muestra en la Tabla 21, los PBL transducidos con mTCR y hTCR demostraron una actividad lítica similar contra la línea de células tumorales NY-ESO-1 $^+$ /HLA-A\*0201 $^+$  de melanoma 624.38mel. Hubo poca o ninguna lisis de la línea celular HLA-A\*0201 $^+$  938 mel, y los PBL transducidos con GFP no mostraron reactividad contra ninguna de las células diana (Tabla 21).

TABLA 21

Diana positiva: células 624.38			
Efecto: razón diana	10:1	30:1	60:1
GFP	-9	-3	-2
TCR 1G4-LY	29	59	58
mESO $\beta$ TCR	31	59	60
Diana negativa: células 938			
Efecto: razón diana	10:1	30:1	60:1
GFP	-19	-22	-34
TCR 1G4-LY	-13	-11	-10
mESO $\beta$ TCR	-13	-10	-10

## EJEMPLO 17

Este ejemplo demuestra la actividad antitumoral de las células transducidas con un TCR mESO $\beta$  o TCR humano utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células de empaquetamiento del Ejemplo 13.

30 35 También se investigó la actividad antitumoral de los linfocitos T CD4+ transducidos con el mTCR y el hTCR. Los PBL transducidos con hTCR NY-ESO-1 y mTCR NY-ESO-1 se enriquecieron con cuentas magnéticas CD4+, a continuación, se cultivaron conjuntamente durante 16 horas con un panel de líneas celulares derivadas de melanoma y tumor de pulmón HLA-A\*0201 $^+$  y HLA-A\*0201 $^+$ . Los linfocitos T CD4+ transducidos con el mTCR y el hTCR tuvieron una liberación específica de IFN- $\gamma$  cuando se cultivaron conjuntamente con las líneas celulares HLA-A\*0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$  pero no con las líneas celulares HLA-A\*0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$  (Tabla 22).

TABLA 22

	IFN- $\gamma$ pg/ml (donante I)		
	H1299A2	624.38	938
No transducido	0	31	0
TCR 1G4-LY	22684	7020	0
mESO $\beta$ TCR	21376	3754	41
IFN- $\gamma$ pg/ml (donante J)			
	H1299A2	624.38	938
No transducido	1158	0	0
TCR 1G4-LY	22786	2594	0
mESO $\beta$ TCR	22331	481	14

## EJEMPLO 18

Este ejemplo demuestra el reconocimiento específico de diferentes histologías tumorales por células transducidas con un TCR mESO $\beta$  utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células de empaquetamiento del Ejemplo 13.

40 45 Para evaluar el reconocimiento específico de diversas histologías tumorales, se cultivaron conjuntamente PBL

transducidos con mTCR NY-ESO-1 con diferentes líneas celulares HLA-A\*0201<sup>+</sup>/ NY-ESO-1<sup>+</sup> derivadas de melanoma (A375), cáncer de pulmón de células no pequeñas (H1299-A2), neuroblastoma (SKN AS-A2), cáncer de mama (MDA-435S-A2) y osteosarcoma (Saos2). Se observó una liberación específica de IFN-γ (Tabla 23).

5

TABLA 23

	IFN-γ pg/ml	
	No transducido	mESOβα TCR
A375	0	5710
H1299-A2	132	21222
MDA-435S-A2	1181	3057
SKN AS-A2	1417	5097
Saos2	117	12092

## EJEMPLO 19

Este ejemplo demuestra el reconocimiento de células tumorales tratadas con DAC por PBL transducidos con un TCR mESOβα.

El aumento de las concentraciones del agente desmetilante de ADN 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina; DAC) induce la expresión de varios antígenos de cáncer de testículo en las células de cáncer de pulmón (Rao et al., Ther. Tar. and Chem. Bio., 71: 4192-4204 (2011)). Sin estar ligado a una teoría o mecanismo concretos, se cree que la DAC puede, potencialmente, regular por incremento la expresión de NY-ESO-1 en células cancerosas, lo que puede mejorar la capacidad de los TCR para reconocer NY-ESO-1.

Se cultivaron conjuntamente PBL transducidos o no transducidos con mTCR NY-ESO-1 durante 16 horas con las líneas de células diana tumorales de diferentes histologías (mostradas en las Tablas 24A-24B) que habían sido expuestas a DAC a las concentraciones mostradas en las Tablas 24A-24B durante 72 horas. Se midieron los niveles de interferón-gamma. Los resultados se muestran en la Tabla 24A-24B.

TABLA 24A

Concentración de DAC (mM/L)	Cáncer de próstata (células pC3A2)	
	No transducido	IFN-γ (pg/ml) mESOβα TCR del clon C1
Sin tratar	159	336
0,1	289	1566
0,5	188	1766
1,0	282	1912
10	361	1520

25

TABLA 24B

Concentración de DAC (mM/L)	Cáncer colorrectal (células SW480)	
	No transducido	IFN-γ (pg/ml) mESOβα TCR del clon C1
Sin tratar	118	135
0,1	141	196
0,5	169	239
1,0	98	255
10	80	388

Como se muestra en las Tablas 24A y 24B, el PBL transducido con el TCR mESOβα demostró una mayor reactividad hacia el cáncer de próstata diana tratado con DAC y el cáncer colorrectal, respectivamente, en comparación con las células diana no tratadas.

30

## EJEMPLO 20

Este ejemplo demuestra el reconocimiento de células T2 pulsadas con péptidos NY-ESO-1 sustituidos con alanina por PBL transducidos con el TCR mESOβα o TCR humano.

35

Se cultivaron conjuntamente PBL humanos no transducidos o PBL humanos transducidos con mTCR (mESOβα del clon C1), hTCR (TCR 1G4-LY) o proteína verde fluorescente (GFP) durante 16 horas con células T2 no tratadas o células T2 que se pulsaron previamente con diferentes concentraciones de péptido como se muestra en las Tablas 25A y 25B. Se midió el interferón gamma. Los resultados se muestran en la Tabla 25A y 25B. Como se muestra en las Tablas 25A y 25B, el mTCR reconoce SEQ ID NO: 24 mientras que el hTCR no lo hace. Además, el hTCR reconoce SEQ ID NO: 27 pero el mTCR no.

TABLA 25A (Donante K)

	péptido pulsado (ng/μl)	No transducido	IFN-γ (pg/ml)		
			GFP	TCR 1G4- LY	mESOβα
Células T2 sin tratar	-	943	358	641	443
SLLMWITQC (SEC ID NO: 2)	10	0	0	3759	5741
SLLMWITQC (SEC ID NO: 2)	1	0	0	678	2111
MART	10	0	0	0	0
MART	1	0	0	0	0
SLAMWITQC (SEQ ID NO: 23)	10	0	0	3271	6287
SLAMWITQC (SEQ ID NO: 23)	1	0	0	1785	2421
SLLAWITQC (SEQ ID NO: 24)	10	0	0	0	2701
SLLAWITQC (SEQ ID NO: 24)	1	0	0	0	3172
SLLMAITQC (SEQ ID NO: 25)	10	0	0	0	0
SLLMAITQC (SEQ ID NO: 25)	1	0	0	0	0
SLLMWATQC (SEQ ID NO: 26)	10	0	0	1114	1194
SLLMWATQC (SEQ ID NO: 26)	1	0	0	884	921
SLLMWIAQC (SEQ ID NO: 27)	10	0	0	5672	0
SLLMWIAQC (SEQ ID NO: 27)	1	0	0	457	0
SLLMWITAC (SEQ ID NO: 28)	10	0	0	0	0
SLLMWITAC (SEQ ID NO: 28)	1	0	0	0	0

TABLA 25B (Donante L)

	péptido pulsado (ng/μl)	No transducido	IFN-γ (pg/ml)		
			GFP	TCR 1G4- LY	mESOβα
Células T2 sin tratar	-	162	126	131	188
SLLMWITQC (SEC ID NO: 2)	10	124	120	754	1168
SLLMWITQC (SEC ID NO: 2)	1	199	112	184	273
MART	10	230	136	123	102
MART	1	155	152	112	108
SLAMWITQC (SEQ ID NO: 23)	10	145	168	1383	1541
SLAMWITQC (SEQ ID NO: 23)	1	120	139	370	505
SLLAWITQC (SEQ ID NO: 24)	10	128	121	185	616
SLLAWITQC (SEQ ID NO: 24)	1	123	111	225	1000
SLLMAITQC (SEQ ID NO: 25)	10	183	163	294	137
SLLMAITQC (SEQ ID NO: 25)	1	119	112	148	214
SLLMWATQC (SEQ ID NO: 26)	10	96	80	297	375
SLLMWATQC (SEQ ID NO: 26)	1	74	70	220	280
SLLMWIAQC (SEQ ID NO: 27)	10	78	95	1026	76
SLLMWIAQC (SEQ ID NO: 27)	1	123	72	208	86
SLLMWITAC (SEQ ID NO: 28)	10	78	83	97	76
SLLMWITAC (SEQ ID NO: 28)	1	85	75	82	74

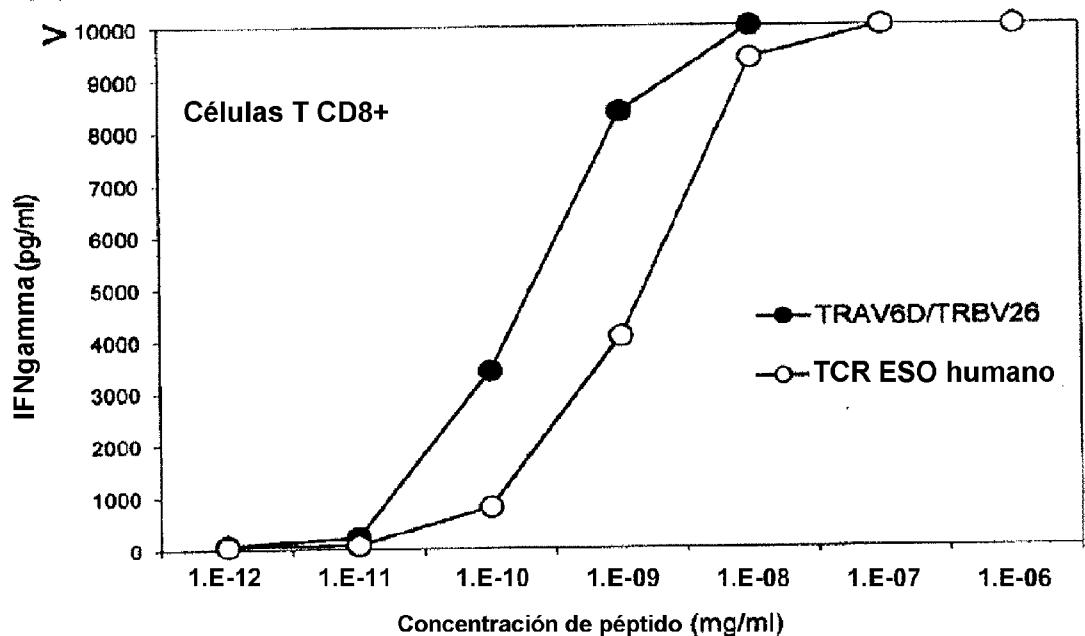
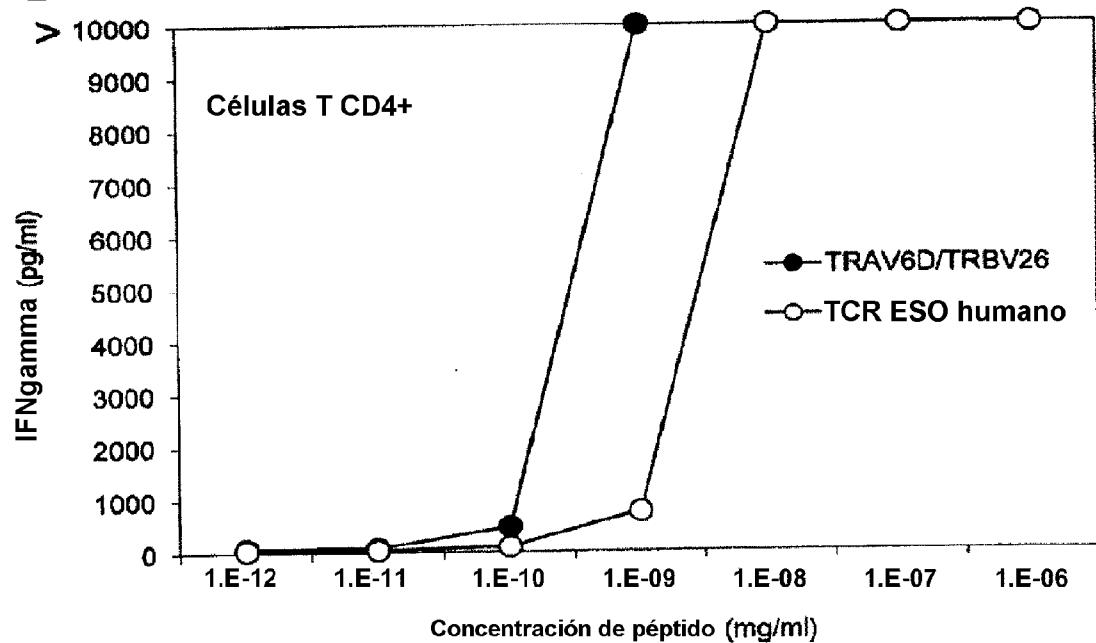
- 5 Se debe interpretar que el uso de los términos "un", "uno", "una", "el" y "la" y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significa "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en la presente memoria está destinada simplemente a servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o el lenguaje ilustrativo (p. ej., "tal como") proporcionado en la presente memoria, está destinado simplemente a iluminar mejor la invención.
- 10
- 15

- 20 La presente invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo el número de proyecto ZIABC010984 por el National Institute of Health, National Cancer Institute. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende (a) un vehículo farmacéuticamente aceptable y (b) una población de células que comprende al menos una célula anfitriona que comprende un vector de expresión recombinante,
- 5 en donde el vector de expresión recombinante comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de células T (TCR) aislado o purificado,
- 10 en donde el TCR comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de la cadena alfa (CDR) 1 de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, y tiene especificidad antigenica para NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1),
- 15 en donde la composición farmacéutica es (i) una formulación parenteral, (ii) una formulación intravenosa o (iii) una formulación inyectable.
- 20 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el TCR tiene especificidad antigenica para NY-ESO-1<sub>157-165</sub> (SEQ ID NO: 2).
- 25 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en donde el TCR comprende:
- (a) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10; o
- (b) las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12.
- 30 4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la población de células es
- (a) autóloga para el receptor previsto; o
- (b) alogénica para el receptor previsto.
- 35 5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la secuencia de nucleótidos tiene codones optimizados.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la secuencia de nucleótidos comprende SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, tanto SEQ ID NO: 15 como 16, o tanto SEQ ID NO: 19 como 20.
- 40 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 está situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, opcionalmente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 17.
- 45 8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 está situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, opcionalmente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 18.
- 50 9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las células son humanas.
10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición farmacéutica es una formulación parenteral.
- 55 11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición farmacéutica es una formulación intravenosa.
12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición farmacéutica es una formulación inyectable.
- 60 13. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la composición farmacéutica comprende solución salina.

14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la composición farmacéutica es isotónica con la sangre del receptor previsto.
- 5 15. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la composición farmacéutica comprende una solución de inyección estéril acuosa que es isotónica con la sangre del receptor previsto.

**A****B****Fig. 1**

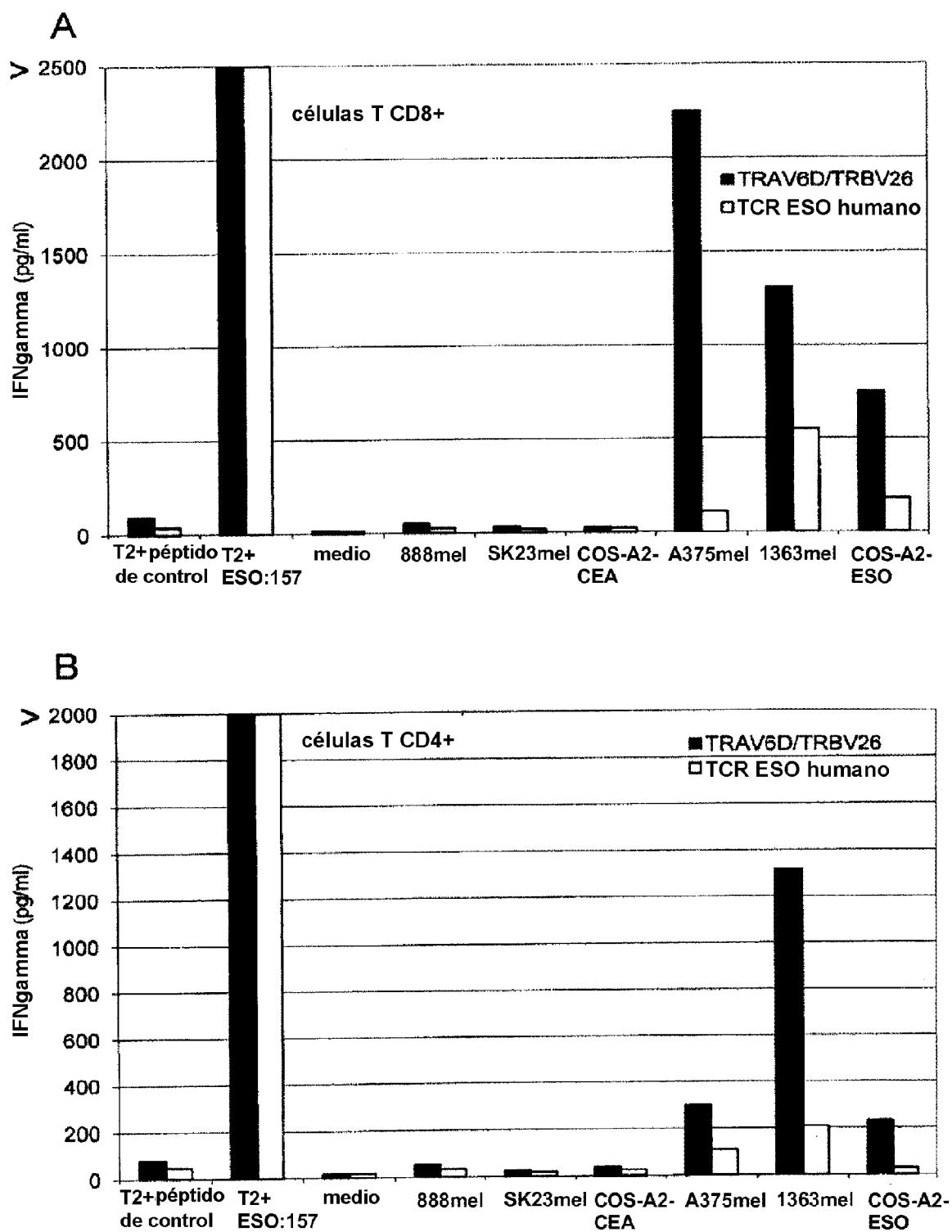


Fig. 2