

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 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

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

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

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

30 Prioridad:

22.05.2012 US 201261650020 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2025

73 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**

72 Inventor/es:

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

74 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

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

Referencia cruzada a una solicitud relacionada

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.

Incorporación como referencia de material enviado electrónicamente

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.

Antecedentes de la invención

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_{aa157-185} media en la regresión tumoral en pacientes con melanoma metastásico y sarcoma de células sinoviales.

Breve compendio de la invención

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

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

2. La composición farmacéutica del artículo 1, en donde el TCR tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (SEQ ID NO: 2).

3. La composición farmacéutica del artículo 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.

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

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

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

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.

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.

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 divulgan anticuerpos, o una porción de unión a antígeno de los mismos, y composiciones farmacéuticas relacionadas con los TCR.

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.

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

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-1₁₅₇₋₁₆₅.

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-1₁₅₇₋₁₆₅, o una de varias líneas de células tumorales 888mel (NY-ESO-1⁻), Sk23mel (NY-ESO-1⁻), COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺) o COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺).

Descripción detallada de la invención

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. 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.

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

La frase "que tiene especificidad antigénica", 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.

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.

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.

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.

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.

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

como una cadena α de un TCR, una cadena β de un TCR, una cadena γ de un TCR, una cadena δ de un TCR o una combinación de los mismos. Los polipéptidos del TCR de la invención pueden comprender cualquier secuencia de aminoácidos, siempre que el TCR tenga especificidad antigénica para NY-ESO-1 y comprenda una región variable murina.

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 SEQ ID NO: 3 (CDR1 de la cadena α), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (CDR2 de la cadena α) y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (CDR3 de cadena α), y la segunda cadena polipeptídica comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (CDR1 de cadena β), una CDR2 que comprende el aminoácido secuencia de SEQ ID NO: 7 (CDR2 de cadena β), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (CDR3 de cadena β). 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.

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 α) o 10 (la región variable de una cadena β), o tanto SEQ ID NO: 9 como 10. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 10.

Alternativa o adicionalmente, el TCR puede comprender una cadena α de un TCR y una cadena β de un TCR. Cada una de las cadenas α y β del TCR puede comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena α comprende la región variable de una cadena α 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 β de un TCR. Preferiblemente, la cadena β del TCR comprende la región variable de una cadena β 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.

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.

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.

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.

El polipéptido puede comprender una porción funcional de una o ambas cadenas α y β 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 α y/o cadena β 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 α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), 8 (CDR3 de cadena β) 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.

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 α) o 10 (la región variable de una cadena β), o tanto SEQ ID NO: 9 como 10. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10.

Alternativa o adicionalmente, el polipéptido puede comprender la longitud completa de una cadena α o β 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.

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.

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 tándem) 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.

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).

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 α y la cadena β . Se puede utilizar cualquier péptido conector adecuado para conectar la cadena α y la cadena β 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 α y β separadas.

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)₂' 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 tándem) 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.

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.

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.

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.

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 12, o tanto SEQ ID NO: 11 como 12. Asimismo, por ejemplo, los TCR, polipéptidos o proteínas pueden consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 9 o 10, o tanto SEC ID NO: 9 como 10. Además, los TCR, polipéptidos o proteínas pueden consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), 8 (CDR3 de cadena β), o cualquier combinación de los mismos, p. ej., SEQ ID NO: 3-5, 6-8 o 3-8.

Los TCR, polipéptidos y proteínas desvelados en la presente memoria (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales) pueden tener cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los TCR, polipéptidos o proteínas (o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos) conserven su actividad biológica, p. ej., la capacidad de unirse específicamente a NY-ESO-1, detectar cáncer en un mamífero o tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, etc. Por ejemplo, el polipéptido puede tener de 50 a 5000 aminoácidos de longitud, tal como como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud. A este respecto, los polipéptidos también incluyen oligopéptidos.

Los TCR, polipéptidos y proteínas desvelados en la presente memoria (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales) de la invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos de origen natural. Tales aminoácidos sintéticos son conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., ácido aminociclohexano carboxílico, norleucina, ácido α -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometilcisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina, β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano carboxílico, ácido α -aminociclohexano carboxílico, ácido α -aminocicloheptano carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α , β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

Los TCR, polipéptidos y proteínas desvelados en la presente memoria (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales) pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse mediante, p. ej., un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

Cuando los TCR, polipéptidos y proteínas desvelados en la presente memoria (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales) están en forma de sal, preferiblemente, los polipéptidos están en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen las derivadas de ácidos minerales, tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y los ácidos orgánicos, tales como los ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido *p*-toluenosulfónico.

El TCR, el polipéptido y/o la proteína desvelados en la presente memoria (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden obtener mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos adecuados de la síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas se describen en referencias, tales como Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2005; Peptide and Protein Drug

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, 3ª 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., bioconjugados, 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 anfitrionas, poblaciones de células anfitrionas 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 fosforamidoato 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, deleciones, 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, deleciones, 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, dihidrouacilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N⁶-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-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 α con codones optimizados), SEQ ID NO: 16 (cadena β con codones optimizados), SEQ ID NO: 21 (región variable con codones optimizados de la cadena α), SEQ ID NO: 22 (región variable con codones optimizados de la cadena β), 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 λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. 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 ColEI, plásmido de 2 μ m, λ , 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 nitrorreductasa.

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 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β , y la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α está situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β . Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β puede estar situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α . 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

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.

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 porción 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 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β , y la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α está situada 3' respecto a la secuencia de nucleótidos, que codifica CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β . Asimismo, la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β puede estar situada 5' respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α . 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.

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.

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 α , 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 α . 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.

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 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 Th1 y Th2, 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 $^{+}$.

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.

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 α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), 8 (CDR3 de cadena β), 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 epítipo 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 isotipo, 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 quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Asimismo, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidéz 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, 5ª 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')₂, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

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 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.

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).

Los TCR, polipéptidos, proteínas (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas (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 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%.

Los TCR, polipéptidos, proteínas (incluidas las porciones funcionales y variantes de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas (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 anfitrionas (incluidas las poblaciones de las mismas) y anticuerpos (incluidas las porciones de 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., asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

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.

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.

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 propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres,

poli(etilenglicol) 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, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros coadyuvantes farmacéuticos.

Los aceites que se pueden utilizar en las formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen cacahuete, 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.

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 olefina-sulfonatos, alquil-, olefina-, éter- y monoglicérido-sulfatos y -sulfosuccinatos, (c) detergentes iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (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.

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 tapones. 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 secado 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.

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, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)). Preferiblemente, cuando se administran células, p. ej., células dendríticas, las células se administran mediante inyección.

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.

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.

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.

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

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
 30 materiales de TCR y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en donde los materiales de TCR están 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.

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
 35 anfitrionas 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 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
 40 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
 45 memoria o cualquier célula anfitriona o población de células que comprendan 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.

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
 50 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.

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
 60 cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, 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.

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*.

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).

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.

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, rhabdomyosarcoma 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, 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 tiroides, cáncer de ovario, o sarcoma de células sinoviales.

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. Se prefiere que los mamíferos sean del orden Carnivora, incluidos Felídeos (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 Perisodactyla, incluidos los Équidos (caballos). Lo más preferido es que los mamíferos sean del orden Primates, Ceboideos o Simioides (monos) o del orden Antropoides (humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

Ejemplos

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

Líneas celulares

Se generaron líneas de melanoma 1300mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 624,38mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), A375mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 938mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁻), 888mel (NY-ESO-1⁻, HLA-A2⁻), SK23mel (NY-ESO-1⁻, HLA-A2⁺), 1359mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁻), 1359-A2mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 624mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺) y 1390mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), a partir de lesiones tumorales resecadas 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⁺, HLA-A2⁺), (ATCC CRL-1550) la línea celular de osteosarcoma Saos2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), (ATCC HTB-85) y la línea celular de neuroblastoma SK-NAS-A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), (ATCC CRL-2137), la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas H1299A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), la línea celular de carcinoma de mama MDA-MB-435S-A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), (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

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

Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-A2 con 100 µg de péptido (NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅) 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-1₁₅₇₋₁₆₅ en cada uno de los dos lados de la cola), seguido de un refuerzo una semana después con la misma inmunización.

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.

Día 7: Se evaluó la reactividad específica de los cultivos masivos mediante la secreción de IFNγ 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

	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias 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	41	266	200	71
T2+ ESO:157	+	+	np	<u>549</u>	<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	-	-	-	-

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: 5x10⁴ células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad): 5x10⁴ células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

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: 2x10⁵ células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad): 1x10⁶ células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

Días 37-44: Se evaluó la reactividad específica de los clones a través de la secreción de IFNγ en el cultivo conjunto con las líneas de células tumorales establecidas en la Tabla 2. 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 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

	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	B	H
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	11.781	16.436
A375mel	+	+	59,08	383	1.954
624mel	+	+	4,14	363	14.298
1390mel	+	+	np	288	17.567
1363mel	+	+	np	3.582	-
COS-A2-CEA	+	-	np	348	289
COS-A2-ESO	+	+	np	>14.000	>14.000
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: 5x10⁵ células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad): 1x10⁶ células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2. Los clones reestimulados se congelaron instantáneamente para la preparación de ARN.

EJEMPLO 2

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

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.

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: 4x10⁵ células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad): 1x10⁶ células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

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	1.058
T2+ ESO:157	+	+	np	79.524	72.730	47.871	1.899
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	-	-	-	-

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: 5x10⁵ células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3000 rad): 1x10⁶ células/pocillo; y (iii) 10 CU/ml de IL-2.

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 IFN γ (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

	<u>HLA-A2</u>	<u>NY-ESO-1</u>	<u>Copias de 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>	<u>TE8 (clon de células I humanas)</u>
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	852	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	-	-	-	-	-

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.

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 IFN γ (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo.

Los esplenocitos estimulados con esplenocitos HLA-A2+ activados con LPS (3000 rad) pulsados con 1 μ g/ml de péptido de cebado y 10 μ g/ml de β 2-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 μ g/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.

TABLA 5

	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	2	5	5	8	1	50	51	53
T2+ VHB	+	-	np	235	317	223	344	308	335	270	239
T2+ ESO: 157	+	+	np	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000
medias	-	-	np	221	314	231	553	266	232	258	222
838mel	-	-	0.02	210	318	208	288	234	241	244	208
Sx23mel	+	-	0.01	216	309	210	297	278	208	222	207
1359mel	-	+	5.68	243	383	206	422	347	271	212	229
1359-A2	+	+	np	1981	6027	2523	1845	1477	3661	1965	2272
A375mel	+	+	59.08	523	388	232	1455	556	557	558	737
624mel	+	+	4.14	7679	1931	2527	8595	4629	4487	2978	7139
1390mel	+	+	np	1124	17567	352	900	517	379	914	718
1263mel	+	+	np	-	-	-	-	-	-	-	-
COS-A2-CEA	+	-	np	-	-	-	-	-	-	-	-
COS-A2-ESO	+	+	np	-	-	-	-	-	-	-	-
293-A2-gp100	+	-	np	-	-	-	-	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	np	-	-	-	-	-	-	-	-

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 transfectó 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-1₁₅₇₋₁₆₅, COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻), COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1⁻), Sk23mel (NY-ESO-1⁻), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺), 1390 (NY-ESO-1⁺) o 624 (NY-ESO-1⁺). Se midió la secreción de IFN γ . Los resultados se muestran en la Tabla 6 (IFN γ (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	153	5	198	134	236	325	532	32	94	74
Avdex TCR	235	>10.000	7	188	81	>10.000	1637	5752	531	52	2320
TRAV7D-4/TRBV19 ¹	864	>10.000	7	135	102	2262	489	293	39	72	449
TRAV13D-2/TRBV14 ²	197	>10.000	8	152	88	134	159	335	28	75	55
TRAV7D-3/TRBV14 ³	155	368	7	129	112	122	171	378	28	88	71
TRAV6D/TRBV26 ⁴	198	>10.000	11	255	158	>10.000	3859	9973	782	91	3872
TRAV7D-3/TRBV26 ⁵	190	1289	9	208	197	248	189	509	34	79	104
Paciente 2											
GFP	25	39	2	47	27	22	62	88	8	16	19
Avdex TCR	50	>10.000	4	32	22	2484	209	192	150	11	588
TRAV7D-4/TRBV19 ¹	183	>10.000	2	34	15	149	47	39	7	13	50
TRAV13D-2/TRBV14 ²	22	7898	9	27	13	28	42	58	11	22	17
TRAV7D-3/TRBV14 ³	24	23	11	28	13	21	36	38	5	7	13
TRAV6D/TRBV26 ⁴	53	>10.000	39	77	40	3597	777	244	130	32	583
TRAV7D-3/TRBV26 ⁵	10	77	8	28	17	27	32	51	5	15	40
¹ TRAV7D-4/TRBV19: Clon ESO (1 estimulación con LPS) B (Tabla 2 anterior) ² TRAV13D-2/TRBV14: Clon ESO (1 estimulación con LPS) H (Tabla 2 anterior) ³ TRAV7D-3/TRBV14: Clon ESO (3 estimulaciones con LPS) 5 (Tabla 5 anterior) ⁴ TRAV6D/TRBV26: Clones ESO (3 estimulaciones con LPS) 6; ESO (3 estímulos T2) 1; ESO (3 estimulación T2) 83 (Tabla 5 anterior) ⁵ 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 transfectó 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-1₁₅₇₋₁₆₅, COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺), COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1⁻), Sk23mel (NY-ESO-1⁻), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺) o 624 (NY-ESO-1⁺). Se midió la secreción de IFN γ y los resultados se muestran en la Tabla 7 (IFN γ (pg/ml)).

TABLA 7

-T2+ESO: 157-165-												888	SI23	A375	624	1363	COS-A2 CEA	COS-A2 ESO
T2+ VHB	10 ⁻² g/ml	10 ⁻¹¹ g/ml	10 ⁻¹⁰ g/ml	10 ⁻⁹ g/ml	10 ⁻⁸ g/ml	10 ⁻⁷ g/ml	10 ⁻⁶ g/ml	medios				A2-	A2+	A2+	A2+	A2+	A2+	A2+
10 ⁻⁶ g/ml												ESO-	ESO-	ESO-	ESO+	ESO+	ESO-	ESO+
Paciente 3																		
CD8+	TRAV6D/TRBV26	243	236	1075	4267	5170	3396	5067	5142	122	90	70	419	125	1194	56	1041	
	GFP	86	47	27	29	9	17	18	25	12	19	5	18	1	27	11	20	
CD4+	TRAV6D/TRBV26	127	67	69	1836	12835	19161	12495	14641	173	56	43	250	84	361	30	179	
	Avidex	6	0	1	40	1147	2455	3538	5783	17	0	0	25	9	26	10	14	
	GFP	10	0	0	0	0	0	0	0	10	5	0	43	18	47	4	7	
Paciente 4																		
CD8+	TRAV6D/TRBV26	15	55	831	1713	2670	3721	2986	2878	0	0	0	48	15	262	0	380	
	GFP	42	0	0	0	0	0	5	0	0	0	6	5	0	0	2	0	
CD4+	TRAV6D/TRBV26	38	1	58	5774	18051	19691	>20000	>20000	21	7	0	109	35	476	2	241	
	Avidex	25	0	0	200	2923	15574	>20000	18293	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 IFN γ .

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-1₁₅₇₋₁₆₅ y se midió la secreción de IFN γ .

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-1₁₅₇₋₁₆₅, según se midió por la secreción de IFN γ . 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-1₁₅₇₋₁₆₅, según se midió por la secreción de IFN γ , en comparación con las
20 células CD8 $^{+}$ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 humano.

EJEMPLO 5

25 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.

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- humano. 1 TCR. Las células transfectadas se cultivaron solas (medio) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control, células T2
30 pulsadas con NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ péptido, COA-A2-CEA (NY-ESO-1 $^{-}$), COS-A2-ESO (NY-ESO-1 $^{+}$), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1 $^{-}$), Sk23mel (NY-ESO-1 $^{-}$), A375mel (NY-ESO-1 $^{+}$), o 1363mel (NY-ESO-1 $^{+}$). Se midió la secreción de IFN γ .

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 IFN γ . Los linfocitos T humanos CD8 $^{+}$ y CD4 $^{+}$ transfectados con un TCR
35 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 IFN γ 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
45 conjunto con células tumorales de melanoma.

Se transfectó 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
50 pulsadas con péptido de control (HBVc), células T2 pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, COA-A2-CEA (NY-ESO-1 $^{-}$), COS-A2-ESO (NY-ESO-1 $^{+}$), o una de varias líneas celulares de tumores de melanoma 888mel (NY-ESO-1 $^{-}$), Sk23mel (NY-ESO-1 $^{-}$), A375mel (NY-ESO-1 $^{+}$), 1363mel (NY-ESO-1 $^{+}$), A375 (NY-ESO-1 $^{+}$), o 624mel (NY-ESO-1 $^{+}$). Se midió la secreción de IFN γ . Los resultados se muestran en la Tabla 8 (IFN γ (pg/ml)).
55

TABLA 8

	Paciente 5 CD4			Paciente 5 CD8			Paciente 6 CD4			Paciente 6 CD8		
	Codón optimizado	tipo salvaje	GFP	Codón optimizado	tipo salvaje	GFP	Codón optimizado	tipo salvaje	GFP	Codón optimizado	tipo salvaje	GFP
medios	103	62	6	43	60	1	0	0	0	0	0	0
T2+ HBVc	58	37	4	71	108	82	2	17	7	3	12	9
T2+ 10 ⁻¹⁰ M ESO	44	32	0	67	88	46	13	15	6	6	9	14
T2+ 10 ⁻¹¹ M ESO	83	42	0	52	150	30	15	22	7	20	23	2
T2+ 10 ⁻¹⁰ M ESO	69	27	3	221	175	43	13	18	4	193	178	0
T2+ 10 ⁻⁹ M ESO	232	60	0	3149	2485	20	728	555	6	1979	3086	4
T2+ 10 ⁻⁸ M ESO	5158	2979	0	13308	13994	55	15468	12906	7	5382	11217	0
T2+ 10 ⁻⁷ M ESO	13987	9362	1	>20000	>20000	37	23981	21321	8	8914	13127	0
T2+ 10 ⁻⁶ M ESO	15345	9417	0	>20000	>20000	51	26802	25225	6	14734	19768	2
688mel (A2-ESO-)	54	30	8	55	96	37	22	9	8	36	58	37
Sk23mel (A2+ ESO-)	30	24	7	8	26	29	3	0	3	6	29	11
A375 (A2+ ESO+)	239	204	76	525	925	55	114	146	62	190	480	22
624mel (A2+ ESO+)	102	81	57	178	211	24	44	42	6	89	125	0

(continuación)

	Paciente 5 CD4			Paciente 5 CD8			Paciente 6 CD4			Paciente 6 CD8		
	<u>Codón optimizado</u>	<u>tipo salvaje</u>	<u>GFP</u>	<u>Codón optimizado</u>	<u>tipo salvaje</u>	<u>GFP</u>	<u>Codón optimizado</u>	<u>tipo salvaje</u>	<u>GFP</u>	<u>Codón optimizado</u>	<u>tipo salvaje</u>	<u>GFP</u>
1363mel (A2+ ES0+)	<u>605</u>	<u>443</u>	178	<u>864</u>	<u>1421</u>	28	<u>525</u>	<u>576</u>	153	<u>426</u>	<u>1079</u>	20
												np
COS-A2-CEA	68	68	22	51	83	39	8	17	16	4	13	9
COS-A2-ES0	428	92	2	1322	1436	22	1213	431	17	672	1372	10
												4
												0

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 IFN γ .

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.

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-1₁₅₇₋₁₆₅; 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 IPN γ . Los resultados se muestran en la Tabla 9 (IPN γ (pg/ml)).

TABLA 9

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

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 IFN γ .

30 EJEMPLO 8

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

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 α 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 (mESOαβ) (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 (mESOβα) (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 *NcoI* y *NotI*. 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 transfectó a células 293GP para recoger el sobrenadante y transducir PBL en experimentos de transducción posteriores. Como control se utilizó un vector que codificaba GFP.

EJEMPLO 9

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

Se estimularon linfocitos de sangre periférica (PBL) con OKT3 el día 0 (S1). Los PBL se transdujeron con el vector de TCR 1G4, 1G4-LY, mESOαβ o mESOβα 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.

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
mESOαβ TCR	56-90
mESOβα TCR	56-91

Como se muestra en la Tabla 10, los PBL transducidos con el vector de TCR mESOαβ o mESOβα se transdujeron con una eficacia similar en comparación con los vectores que codificaban los TCR 1G4 y 1G4-LY.

EJEMPLO 10

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

Se estimularon PBL de cinco donantes y no se transdujeron o se transdujeron con vectores que codificaban GFP o los TCR 1G4-LY, mESOαβ o mESOβα 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-1₁₅₇₋₁₆₅ enumeradas en la Tabla 12 a continuación. La secreción de IFNγ 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 (IFNγ pg/ml). La eficacia de la transducción (Td) se basó en el análisis FACS de células Vβ13.1+ mβ+.

TABLA 11A

	% eficacia td	<u>268</u>	<u>938</u>	COS-A2-ep100	<u>624.38</u>	<u>H1299-A2</u>	<u>A375</u>	<u>COAS-A2-ESO</u>	<u>1300</u>
Paciente 1 (Dilución 1:10; S1D7)									
No transducido (UT)	N/A	12	0	99	22	17	132	24	61
GFP	90	0	0	91	17	65	95	0	33
TCR 1G4LY	<u>85</u>	<u>13</u>	<u>0</u>	<u>99</u>	<u>3316</u>	<u>8592</u>	<u>3059</u>	<u>1391</u>	<u>5732</u>
mESOαβ TCR	83	239	284	156	<u>5523</u>	<u>9616</u>	<u>4430</u>	<u>1872</u>	<u>6922</u>
mESOβα TCR	83	329	326	42	<u>6721</u>	<u>9898</u>	<u>4176</u>	<u>2270</u>	<u>7798</u>
Paciente 2 (Dilución 1:5; S1D7)									
No transducido (UT)	N/A	44	43	46	44	42	53	46	42
GFP	67	42	42	43	44	40	50	41	41
TCR 1G4LY	63	53	43	44	346	<u>1446</u>	<u>451</u>	132	352
mESOαβ TCR	56	43	44	45	<u>372</u>	<u>1259</u>	<u>415</u>	108	<u>323</u>
mESOβα TCR	56	43	46	45	<u>327</u>	<u>1236</u>	<u>412</u>	136	<u>625</u>
Paciente 3 (Dilución 1:5; S1D10)									
No transducido (UT)	N/A	0	0	0	0	0	48	39	-
GFP	63	0	0	0	0	0	0	0	-
TCR 1G4LY	76	0	305	0	546	<u>770</u>	<u>1020</u>	332	-
mESOαβ TCR	63	0	0	0	111	38	<u>292</u>	13	-
mESOβα TCR	60	0	0	0	<u>413</u>	<u>540</u>	<u>819</u>	<u>283</u>	-

TABLA 11B

Paciente 4 (Dilución 1:5, S1D6)										
	% Id eficacia	Medios	888	938	COS-A2 gp100	624.38	H1299-A2	A375	COS-A2-ESO	
No transducido (UT)	N/A	52	155	35	294	195	122	476	212	
GFP	91%	34	91	22	78	106	62	306	50	
TCR 1G4-LY	75%	86	113	54	313	2172	7187	1671	2394	
mESOαβ TCR	84%	41	131	98	185	1946	5744	1064	1490	
mESOβα TCR	85%	52	130	110	164	2812	7163	1262	1676	
Paciente 5 (Dilución 1:5, S1D6)										
No transducido (UT)	N/A	42	23	12	88	9	8	107	64	
GFP	87%	15	20	15	76	0	11	98	62	
TCR 1G4-LY	25%	63	16	10	20	1172	3156	918	430	
mESOαβ TCR	74%	19	55	22	57	444	917	233	372	
mESOβα TCR	74%	15	32	20	24	810	2417	603	380	

TABLA 12

	% eficacia td	SSX	T2	1 µg/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml	0.1 ng/ml
Paciente 1 (Dilución 1:5; S1D7)								
No transducido (UT)	N/A	0	0	0	0	0	0	0
GFP	90	0	0	0	0	0	0	0
1G4 TCR	85	0	0	<u>2452</u>	<u>2475</u>	<u>1525</u>	<u>851</u>	99
TCR 1G4-LY	85	0	0	<u>2173</u>	<u>1599</u>	<u>1087</u>	<u>677</u>	0
mESOαβ TCR	83	0	0	<u>2825</u>	<u>2210</u>	<u>1904</u>	<u>1060</u>	<u>278</u>
mESOβα TCR	83	0	0	<u>3018</u>	<u>2403</u>	<u>2020</u>	<u>1212</u>	<u>522</u>
Paciente 2 (Dilución 1:5; S1D7)								
No transducido (UT)	N/A	22	20	52	24	21	33	53
GFP	67	17	38	33	39	31	21	20
1G4 TCR	62	19	15	<u>1.963</u>	<u>1.104</u>	<u>860</u>	<u>397</u>	41
TCR 1G4-LY	63	15	19	<u>2441</u>	<u>1280</u>	<u>879</u>	<u>291</u>	40
mESOαβ TCR	56	20	42	<u>4645</u>	<u>1854</u>	<u>1529</u>	<u>535</u>	92
mESOβα TCR	56	38	27	<u>7091</u>	<u>2302</u>	<u>1336</u>	<u>348</u>	<u>262</u>

Las células transducidas con los vectores mESOαβ o mESOβα TCR reconocieron específicamente las líneas de células tumorales diana NY-ESO-1⁺/HLA-A*0201⁺ pero no las líneas celulares HLA-A*0201/ NY-ESO-1⁺ o HLA-A*0201/ NY-ESO-1⁻ según se midió por la secreción de IFNγ (Tablas 11A y 11B). Las células transducidas con los vectores de TCR mESOαβ o mESOβα reconocieron específicamente las células T2 pulsadas con el péptido NY-ESO-1 según se midió por la secreción de IFNγ (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 mESOβα fue ligeramente superior en comparación con la de las células transducidas con el vector de TCR mESOαβ. Los PBL transducidos con los vectores de TCR mESOαβ o mESOβα reconocieron las células T2 pulsadas con tan solo 1 ng/ml, lo que indica que ambos mTCR son receptores de avidéz relativamente alta. El cultivo conjunto de PBL que expresaban los vectores de TCR mESOαβ o mESOβα con células T2 de control que no fueron pulsadas con ningún péptido produjo niveles de fondo de IFN-γ. Las células del Paciente 1 transducidas con el TCR mESOβα tenían niveles más altos de secreción de IFN-γ en comparación con las células transducidas con el TCR mESOαβ para el mismo nivel de péptido. Las células del paciente 2 transducidas con el TCR mESOβα tenían niveles más altos de secreción de IFN-γ en comparación con las células transducidas con el TCR mESOαβ para el mismo nivel de péptido para concentraciones de péptido de 1 µg/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 transdujeron o se transdujeron con vectores que codificaban GFP o los TCR 1G4, 1G4-LY, mESOαβ o mESOβα 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
mESOαβ TCR	82	76	62	46
mESOβα TCR	82	74	62	50

Como se muestra en la Tabla 13, el PBL transducido con el vector de TCR mESOαβ o mESOβα 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 transdujeron o se transdujeron con vectores que codificaban GFP o los TCR 1G4-LY, mESOαβ o mESOβα 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-1₁₅₇₋₁₆₅ enumeradas en la Tabla 15 a continuación. La secreción de IFNγ se midió mediante ELISA nueve días después de la segunda estimulación (S2D9). Los resultados se muestran en las Tablas 14 y 15 (IFNγ pg/ml; Dilución 1:10).

TABLA 14

	% eficacia td	Medios	888	938	COS-A2-gp100	62436	H1299-A2	A375	COAS-A2-ESO	1300
Paciente 1										
No transducido (UT)	N/A	282	181	91	515	78	128	779	-	91
GFP	88	95	87	44	216	44	48	783	-	53
TCR 1G4-LY	76	208	184	105	260	8233	12842	6454	-	2786
mESOαβ TCR	82	129	183	111	121	8132	11976	6152	-	3035
mESOβα TCR	82	92	194	130	148	9104	11381	6226	-	2654
Paciente 2										
(UT)	N/A	297	276	195	231	151	144	353	-	167
GFP37	42	393	380	205	272	146	186	465	-	168
TCR 1G4-LY	37	102	174	53	133	4571	5984	2420	-	2066
mESOαβ TCR	62	125	397	362	170	7382	9590	4681	-	3439
mESOβα TCR	62	137	323	370	130	6345	8250	4236	-	3054

TABLA 15

	% eficacia <u>id</u>	SSX	T2	1 <u>µg/ml</u>	100 <u>ng/ml</u>	10 <u>ng/ml</u>	1 <u>ng/ml</u>	0.1 <u>ng/ml</u>
Paciente 1								
No transducido (UT)	N/A	365	479	123	113	168	168	231
GFP	88	0	30	0	0	0	0	0
1G4 TCR	59	179	275	26446	19424	13530	6988	1277
TCR 1G4-LY	76	185	217	30639	21553	15246	7261	1328
mES $\alpha\beta$ TCR	82	511	516	26427	22062	16950	8601	1873
mES $\alpha\beta$ TCR	82	399	384	27813	23052	16872	8076	2174
Paciente 2								
No transducido (UT)	N/A	976	1281	886	616	680	782	764
GFP	42	660	912	505	697	726	591	763
1G4 TCR	50	279	364	19505	12698	7350	3553	747
TCR 1G4-LY	37	150	110	19416	10632	6799	2495	662
mES $\alpha\beta$ TCR	62	386	460	19960	13887	9970	4488	1025
mES $\alpha\beta$ 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 α / β TCR	mESO β / α 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 α / β	mESO β / α	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 β α para una posible aplicación clínica.

Se utilizó ADN para el vector de TCR mESO β α 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 β 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- γ 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- γ 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 β	IFN- γ 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 β α 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 V β de TCR de ratón y los anticuerpos anti-V β 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
mESOβα TCR	56	61	46	66

5 EJEMPLO 15

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células transducidas con un TCR mESOβα 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-γ al encontrarse con el péptido antigénico 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
- 15 relativamente alta. Después de la expansión del número de células, el mTCR liberó niveles más altos de IFN-γ 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-γ.

20

TABLA 19

Concentración de péptidos	IFN-γ pg/ml Donante H (después de estimulación con OKT3)				
	Células T2 sin péptido	0,1 ng/μl	1 ng/μl	10 ng/μl	100 ng/μl
UT	400	380	329	350	285
GFP	633	455	424	410	412
TCR 1G4-LY	1259	1400	1710	3016	3775
mESOβα TCR	1070	1316	1660	3091	3744
Concentración de péptidos	IFN-γ pg/ml Donante H (después de expandir el número de células)				
	Células T2 sin péptido	0,1 ng/μl	1 ng/μl	10 ng/μl	100 ng/μl
UT	34	47	57	22	28
GFP	34	47	57	22	28
TCR 1G4-LY	24	89	512	2974	4341
mESOβα 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-γ 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
mES0 β 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
mES0 β 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 $\beta\alpha$ utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células de empaquetamiento del Ejemplo 13.

También se comparó la lisis específica de líneas celulares de melanoma por el mTCR y el hTCR. La capacidad del PBL transducido para lisar 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 efector + liberación espontánea de la diana))/liberación total de la diana - liberación espontánea de la diana x 100%, promedio de muestras cuadruplicadas. Se mide poca o ninguna lisis celular como valor negativo.

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

EJEMPLO 17

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

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

EJEMPLO 18

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

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+/ NY-ESO-1⁺ 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	mESO $\beta\alpha$ 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 mESO $\beta\alpha$.

10

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.

15

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.

20

TABLA 24A

Cáncer de próstata (células pC3A2)		
Concentración de DAC (mM/L)	IFN- γ (pg/ml)	
	No transducido	mESO $\beta\alpha$ 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

Cáncer colorrectal (células SW480)		
Concentración de DAC (mM/L)	IFN- γ (pg/ml)	
	No transducido	mESO $\beta\alpha$ 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 mESO $\beta\alpha$ 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 mESO $\beta\alpha$ o TCR humano.

35

Se cultivaron conjuntamente PBL humanos no transducidos o PBL humanos transducidos con mTCR (mESO $\beta\alpha$ 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.

40

TABLA 25A (Donante K)

	péptido pulsado (ng/μl)	IFN-γ (pg/ml)			
		No transducido	GFP	TCR 1G4- LY	mES0βα
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)	IFN-γ (pg/ml)			
		No transducido	GFP	TCR 1G4- LY	mES0βα
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
- 10 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
- 15 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.

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,

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, 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 antigénica para NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1),

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

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el TCR tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (SEQ ID NO: 2).

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

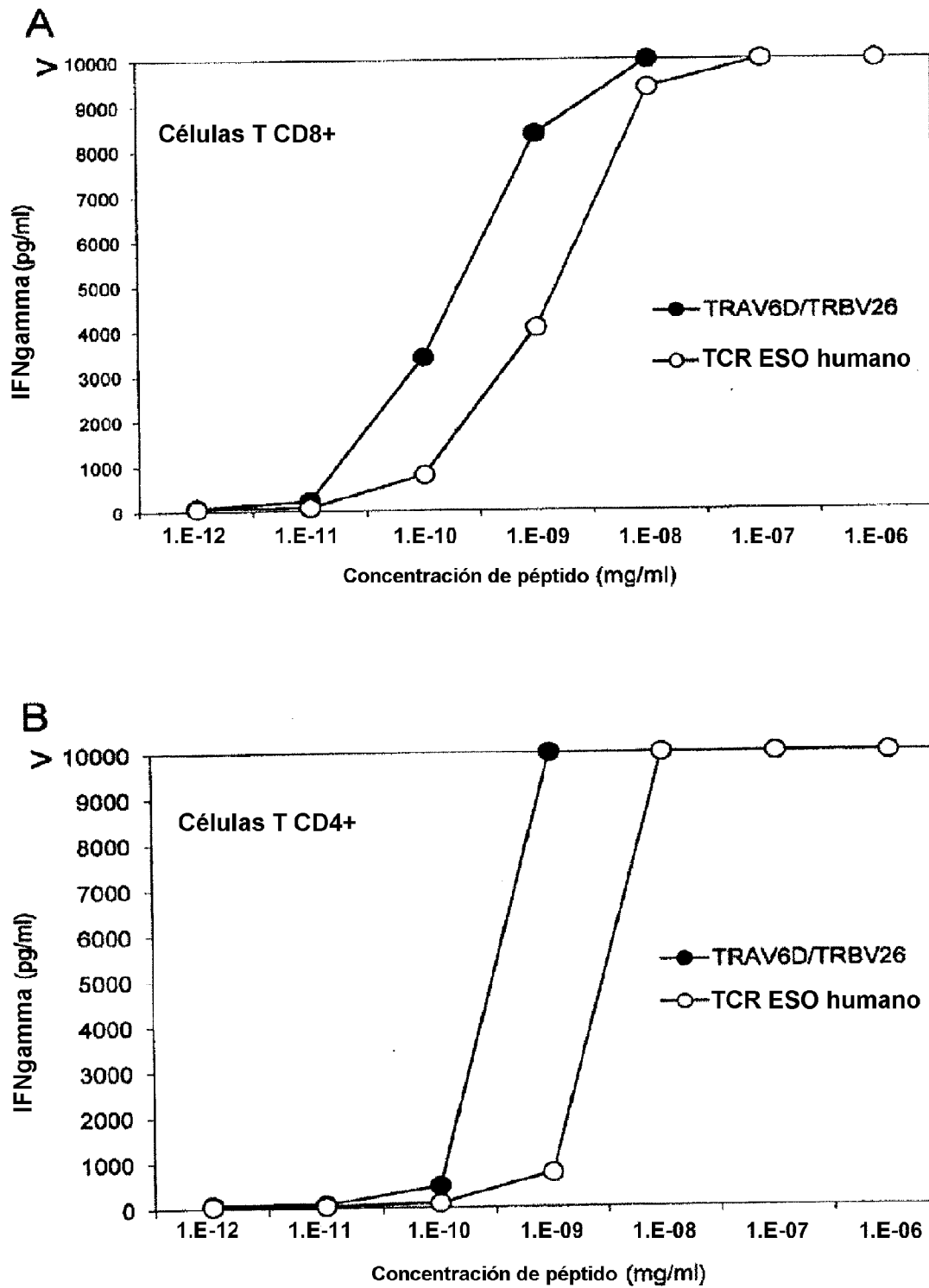


Fig. 1

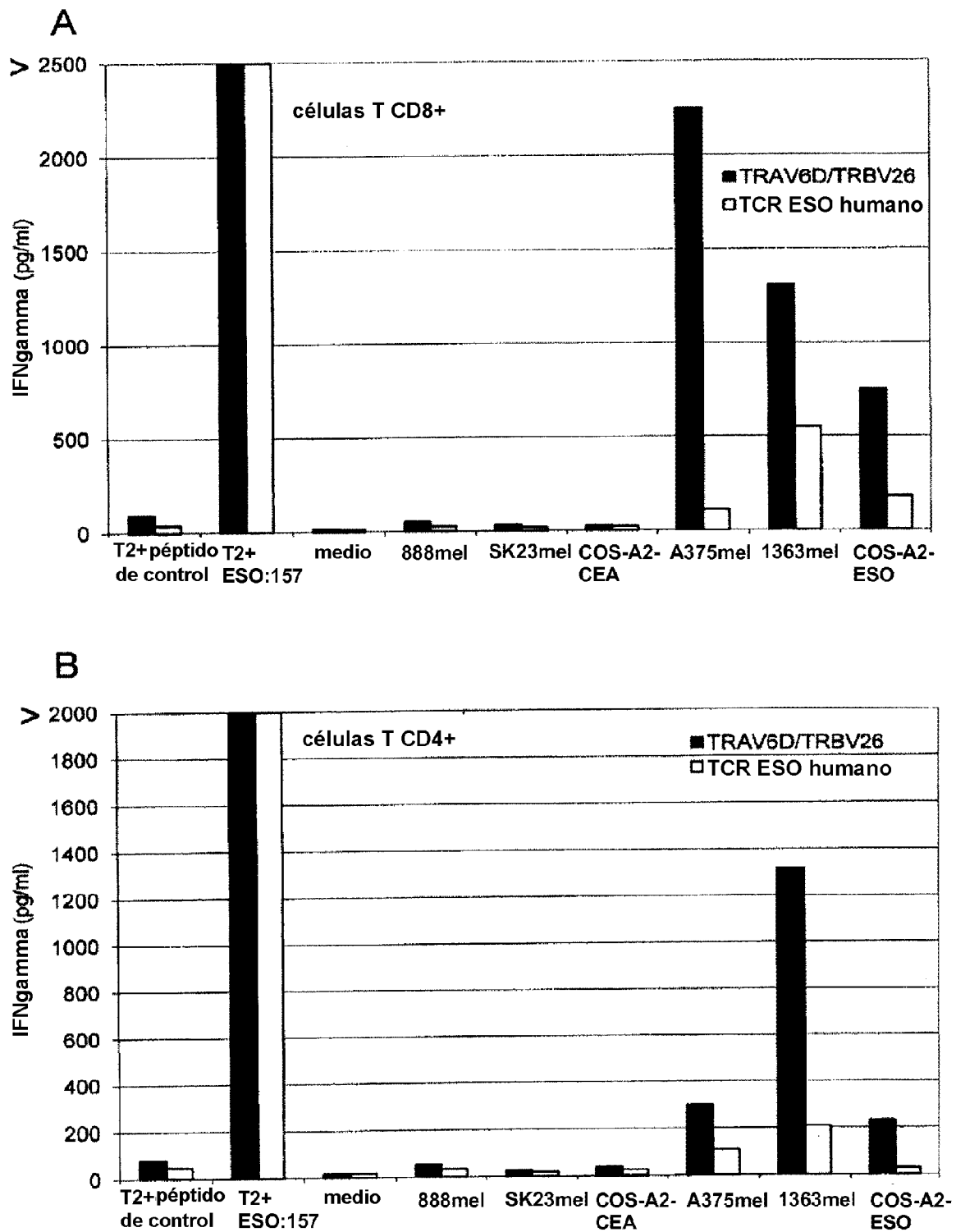


Fig. 2