

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 091**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30	(2006.01)	C12N 1/21	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)	C12N 15/62	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	C12N 15/63	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)	C12N 5/0783	(2010.01)
C07K 14/705	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)	C07K 14/725	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2018** **PCT/JP2018/021561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2018** **WO18225732**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2018** **E 18813904 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024** **EP 3636761**

54 Título: **Proteína de unión a antígeno que reconoce el péptido derivado de MAGE-A4**

30 Prioridad:

05.06.2017 JP 2017111157

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

02.12.2024

73 Titular/es:

MIE UNIVERSITY (100.0%)
1577, Kurimamachiya-cho
Tsu-shi, Mie 514-8507, JP

72 Inventor/es:

SHIKU, HIROSHI;
AKAHORI, YASUSHI;
KATO, YUYA y
MIYAHARA, YOSHIHIRO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 991 091 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

Proteína de unión a antígeno que reconoce el péptido derivado de MAGE-A4

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a la proteína de unión a antígeno que reconoce el péptido derivado de MAGE-A4 y similares.

10 **Antecedentes de la técnica**

Actualmente, los tumores malignos representan más del 30 % de las muertes y son la principal causa de muerte en los países desarrollados. Algunos cánceres se pueden curar con atención médica avanzada, pero otros son difíciles de tratar. Es una tarea urgente desarrollar nuevos tratamientos para el cáncer. Para tratar el cáncer, la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son tres terapias muy importantes. La combinación de las tres terapias se usa para tratar el cáncer.

Recientemente, la cuarta terapia contra el cáncer llamada inmunoterapia ha progresado, con foco en la no invasividad y la alta eficacia de la inmunoterapia. La inmunoterapia se clasifica aproximadamente en tres tipos, es decir, vacunación, terapia de anticuerpos y terapia de transfusión celular. En la terapia de transfusión celular, se conocen dos tipos de terapias. Una es la terapia de transfusión de linfocitos transferidos por el gen del receptor de linfocitos T, en donde el gen del receptor de linfocitos T (TCR) que reacciona específicamente contra el cáncer se induce en los linfocitos del paciente *in vitro* y se infunde al paciente. La otra es la terapia de transfusión de linfocitos T específica, en donde un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés), que contiene scFv como sitio de reconocimiento de antígeno, y CD3ζ, como molécula de transducción de señales intracelulares, se transfunde a los linfocitos del paciente, y los linfocitos se infunden al paciente. En estos tratamientos, puesto que una gran cantidad de linfocitos que comprenden especificidad por un antígeno de cáncer se producen mediante transducción génica en poco tiempo, se pueden aplicar terapias de linfocitos T específicas a diversos tipos de pacientes con cáncer.

La terapia de infusión del gen de TCR, en donde el complejo MHC peptídico (pMHC, por sus siglas en inglés) es reconocido por los linfocitos T y las células cancerosas se destruyen, es seguro y eficaz, y se ha desarrollado mundialmente. Sin embargo, existe el problema de que los clones de linfocitos T citolíticos son extremadamente difíciles de aislar.

Por otro lado, hay tres ventajas en la terapia de infusión de CAR. (1) Diversos pacientes pueden recibir la terapia, dado que los linfocitos T transfectados con CAR que comprenden anticuerpo monocatenario (scFv) y receptor de linfocitos T (TCR) y dominio de señalización de moléculas coestimuladoras pueden reconocer un antígeno canceroso independientemente del MHC y atacar células cancerosas, diferentes de los linfocitos T originales, (2) los linfocitos T positivos para CD4, así como los linfocitos T positivos para CD8 y las células no T se pueden ver afectados para actuar, (3) se mantiene una mayor afinidad en comparación con TCR, porque se hereda la reactividad de un anticuerpo. De hecho, se ha publicado que la terapia con CAR usando anticuerpo anti-CD 19 tiene alta eficacia clínica para pacientes con leucemia y linfoma (Documento no de patente 1: los documentos se resumen al final). La molécula de CD19 también se expresa en linfocitos B, la desaparición de las linfocitos B se puede cubrir mediante un suplemento de inmunoglobulina. En general, es ideal usar antígenos expresados sólo en células cancerosas. Sin embargo, existe el problema de que dichos antígenos de superficie celular no se han observado en la actualidad.

Por otro lado, se han publicado antígenos específicos de cáncer en moléculas intracelulares, incluyendo antígeno de testículo canceroso y neoantígeno. Sin embargo, la terapia de infusión de CAR con antígenos intracelulares específicos de cáncer, todavía no se conoce.

En vista de dichas circunstancias, los inventores aislaron anticuerpos que reconocen el complejo de MHC y péptidos derivados de antígenos intracelulares, y construyeron la inmunoterapia con CAR usando el anticuerpo. Sólo se han publicado unos pocos anticuerpos que reconocen específicamente el complejo péptido/MHC (Documento no de patente 2). Si se puede producir un anticuerpo que reconozca específicamente el complejo péptido/MHC y los linfocitos T-CAR que destruyen específicamente las células cancerosas, esto se convertiría en una terapia innovadora. El CAR que reconoce el complejo péptido/MHC se puede usar para la infusión de linfocitos T CAR, y cuando el péptido que es reconocido específicamente por los linfocitos T-CAR se infunde simultáneamente, se puede esperar la proliferación de linfocitos T-CAR mediante presentación de antígenos. El documento WO 2016/199141 divulga un anticuerpo similar al receptor de linfocitos T con afinidad por MAGE-A4/HLA-A2 (C106B9). El documento WO 2016/199141 demuestra que C106B9 muestra una unión inespecífica a MAGE-A4/HLA-A2 cuando el péptido de MAGE-A4 comprende mutaciones de alanina en las posiciones 1, 2, 8 y 9 (véanse las páginas 82-83 y la Figura 55).

Sumario de la invención

[Problemas a resolver con la invención]

La invención se ha realizado en vista de los problemas descritos anteriormente, y su propósito es proporcionar una

proteína de unión a antígeno que reconozca específicamente el complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2.

[Medios para resolver los problemas]

- 5 Se usó la molécula MAGE-A4 como el antígeno a presentar al MHC. MAGE-A4 se expresa en cánceres sólidos incluyendo el melanoma maligno (documento no de patente 3) y es CTA (antígeno testicular canceroso) como NY-ESO-1. Estas moléculas se expresan únicamente en los testículos y la placenta, no observándose en otros tejidos normales. Después de que MAGE-A4 se expresa en las células, experimenta degradación en el proteasoma. Después de la degradación, se producen péptidos de MAGE-A4 que contienen 10 aminoácidos, se asocian a HLA-A* 0201, microglobulina beta-2 en el retículo endoplásmico y se presentan en la superficie celular como un antígeno específico de cáncer. Como el péptido presentado en HLA-A* 0201, se seleccionó p230-239 (GVYDGREHTV: SEQ ID NO:1) (Documento no de patente 4).

- 15 Se establecieron métodos para producir un linfocito T-CAR que presenta una respuesta específica al cáncer diana mediante la transfección de CAR que reconoce específicamente el A2-MAGE-A4 en linfocitos humanos, y para aplicar la célula a la terapia de infusión celular para seres humanos. (1) Se aislaron anticuerpos que reconocen el complejo de péptido derivado de MAGE-A4 y HLA-A2 con alta afinidad, (2) se examinó la especificidad de los anticuerpos, (3) se cribaron anticuerpos con alta especificidad, (4) se prepararon linfocitos T-CAR usando el anticuerpo, se activaron específicamente mediante la célula diana cancerosa, se provocó citotoxicidad, y se confirmaron. En el modelo de terapia contra el cáncer con ratones trasplantados con tumor humano infundidos con linfocitos T-CAR *in vivo*, se observó que los linfocitos T-CAR proliferaban específicamente en el cuerpo del ratón y se infiltraban en el tumor. Por lo tanto, la invención se completó básicamente.

- 25 Una proteína de unión a antígeno en la invención se caracteriza por que comprende el siguiente polipéptido de (A) o (B), y reconoce el complejo HLA-A2-MAGE-A4: (A) el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de VH (región variable de cadena pesada) de SEQ ID NO: 36 y la secuencia de aminoácidos de VL (región variable de cadena ligera) de SEQ ID NO: 38; (B) el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de homología de VH (región variable de cadena pesada) de SEQ ID NO: 36 y la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de homología de VL (región variable de cadena ligera) de SEQ ID NO: 38. En ese momento, se prefiere que la proteína de unión a antígeno comprenda el siguiente polipéptido (C) o (D) entre VH y VL: (C) el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sc (cadena sencilla) de SEQ ID NO: 37; (D) el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de sc (cadena sencilla) de SEQ ID NO: 37. Adicionalmente, se prefiere que la proteína de unión a antígeno comprenda el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, o el polipéptido que tiene al menos un 90 % de homología de SEQ ID NO: 32. Se prefiere que la proteína de unión a antígeno sea Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario (scFv). En la memoria descriptiva, la proteína de unión a antígeno contiene un anticuerpo en sí o un derivado de anticuerpo.

- 40 En la invención, homología significa la relación entre dos (o tres o más) secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos determinadas comparándolas. Homología significa el grado de correlación por la alineación entre secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos, o entre una serie de secuencias parciales. Específicamente, se determina por la identidad y retención de secuencia (sustitución para mantener las propiedades fisicoquímicas de un aminoácido o secuencia de aminoácidos particular en la secuencia). El método para determinar la homología es preferentemente uno que contrasta la alineación más larga entre las secuencias. Para determinar la homología, se usan programas a través de Internet, por ejemplo, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Se prefiere que el polipéptido tenga al menos un 90 % de homología (preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %) de SEQ ID NO: 32,36,37,38 y que reconozca el complejo HLA-A2-MAGE-A4.

- 50 En otra invención, un ácido nucleico codifica la proteína de unión a antígeno de acuerdo con la primera invención.

- En otra invención, un vector comprende el ácido nucleico. En donde el ácido nucleico incluye ADN o ARN. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Los vectores incluyen un vector plasmídico y un vector vírico y similares.

- 55 En otra invención, un receptor de antígeno quimérico incluye la proteína de unión a antígeno y un dominio intracelular de una proteína de transducción de señales. En ese momento, la proteína de transducción de señales es preferentemente una cualquiera de la cadena CD3zeta (CD3ζ) y las moléculas coestimuladoras CD (GITR). Se prefiere que comprenda además uno cualquiera de entre el dominio intracelular de CD28 y GITR.

- 60 En otra invención, un ácido nucleico codifica el receptor de antígeno quimérico. En otra invención, un vector incluye el ácido nucleico.

- En otra invención, una célula expresa el receptor de antígeno quimérico. En otra invención, una composición farmacéutica comprende la célula como principio activo.

- 65 [Efectos de la invención]

De acuerdo con la invención, se proporciona una proteína de unión a antígeno que reconoce específicamente el complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2, ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a antígeno, vectores que contienen los ácidos nucleicos, receptores de antígeno quiméricos que se unen a la proteína de unión a antígeno, ácidos nucleicos que codifican el receptor de antígeno quimérico, vectores que contienen los ácidos nucleicos, células que expresan el receptor de antígeno quimérico y composiciones farmacéuticas que comprenden las células. La proteína de unión a antígeno que reconoce específicamente el complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2 se puede usar en terapia celular y en el campo de la terapia génica. Y la proteína es extremadamente útil para la detección de células tumorales que expresan complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2, para el tratamiento, la investigación y los ensayos del tumor. Además, se pueden usar linfocitos T-CAR de la invención para una terapia eficaz contra el cáncer, puesto que sus efectos secundarios son pequeños.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la imagen de secuencia de scFV de MAGE n.º 17.
 La Figura 2 muestra la imagen de secuencia génica para explicar el método de construcción de CAR.
 Las Figuras 3 (A) y (B) muestran los gráficos de barras que ilustran los resultados de la reactividad de los clones recogidos a múltiples antígenos evaluados mediante ELISA.
 La Figura 4 muestra el gráfico de medición de los valores de KD de MAGE n.º 17. (A) muestra el gráfico de cambios dinámicos en la sensibilidad de detección a lo largo del tiempo, (B) muestra la tabla que muestra los resultados del cálculo de los valores de KD basándose en los datos leídos del gráfico, respectivamente.
 La Figura 5(A) muestra el gráfico de los resultados del examen de las cantidades de desplazamiento obtenidas haciendo reaccionar los anticuerpos MAGE n.º 17, n.º 86, n.º 209, n.º 345 y n.º 672 con células T2 pulsadas con MAGE-A4p230, CMV y DMSO, (B) muestra los gráficos de barras de los resultados.
 La Figura 6 muestra el gráfico de los resultados del examen de las cantidades de HLA en la superficie de las células T2 pulsadas con los péptidos sustituidos con alanina medidos mediante FACS.
 La Figura 7 muestra el gráfico de los resultados del examen del aminoácido relacionado con el reconocimiento de anticuerpos haciendo reaccionar MAGE n.º 17 con células T2 pulsadas con los péptidos sustituidos con alanina.
 La Figura 8 muestra el gráfico de los resultados del examen de las cantidades de HLA de la superficie de las células T2 pulsadas con péptidos de riesgo medidos mediante FACS.
 La Figura 9 muestra el gráfico de los resultados del examen de la reactividad con los péptidos de riesgo haciendo reaccionar MAGE n.º 17 con células T2 pulsadas con los péptidos de riesgo.
 La Figura 10 muestra los resultados de examinar si se expresó o no CAR(mRNA) introducido en PBMC, por tinción de tetrámero.
 La Figura 11 muestra los gráficos de los resultados de que los linfocitos T-CAR transfectados con ARNm reconocen las células diana específicamente y aumentan la producción de IFN γ .
 La Figura 12 muestra los resultados de examinar si se examinó o no el gen de CAR (retrovirus) introducido en las PBMC, por tinción de tetrámero.
 La Figura 13 son gráficos que muestran que los linfocitos T-CAR transfectados con retrovirus reconocen específicamente las células diana y aumentan la producción de IFN γ .
 La Figura 14 es el gráfico que muestra que los linfocitos T transfectados con MAGE n.º 17 CAR se activaron mediante cocultivo con células T2 pulsadas con el péptido de MAGE-A4.
 La Figura 15 es el gráfico que muestra que los linfocitos T transfectados con MAGE n.º 17 CAR se activaron mediante cocultivo con células positivas para MAGE-A4 y positivas para A2.
 La Figura 16 muestra el gráfico de los resultados de que la producción de interferón por T-CAR aumentó cuando las células presentadoras de antígeno que incorporan péptidos largos de MAGE-A4 se cocultivaron con T-CAR.
 La Figura 17 es el gráfico que muestra que las células T2 pulsadas con el péptido de MAGE-A4 tienen la actividad citotóxica específica de MAGE-A4.
 La Figura 18 es el gráfico que muestra que las células diana tienen la actividad citotóxica específica contra las células positivas para MAGE y positivas para A2.
 La Figura 19 muestra los resultados del examen de la tasa positiva para CAR de linfocitos T-CAR infundidos mediante tinción de tetrámero.
 La Figura 20 (A) es el gráfico que muestra los resultados de los efectos de los linfocitos T-CAT contra el tumor positivo para MAGE-A4 y positivo para A2 (NW-MEL-38) y (B) es el gráfico que muestra los resultados de los efectos de los linfocitos T-CAR contra los tumores negativos para MAGE-A4 y positivos para A2 (HCT116).
 La Figura 21 muestra la imagen de secuencia génica de CAR zG.
 La Figura 22 son gráficos que muestran los resultados de los efectos de los linfocitos T-CAR que tienen diferentes dominios intracelulares (ICD) contra tumores (NW-MEL-38) positivos para MAGE-A4 y positivos para A2. (A) muestra el tamaño tumoral, (B) muestra los pesos corporales, respectivamente. Las flechas de la izquierda en los gráficos muestran el día de tratamiento de irradiación corporal (TBI, por sus siglas en inglés) (día 3), las flechas de la derecha muestran la fecha de administración de linfocitos (día 4), respectivamente.
 La Figura 23 son figuras que muestran los resultados del examen de las tasas positivas para CAR de linfocitos T positivos para CD8 sin introducción de CAR (NGMC: control), los linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo zG (zG) y los linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo 28z (28z) mediante tinción de tetrámero.
 La Figura 24 es el gráfico que muestra los resultados de examinar si los linfocitos T-CAR reconocen

específicamente las células objetivo y aumentan la producción de IFN γ .

La Figura 25 es el gráfico que muestra los resultados de examinar si los linfocitos T-CAR reconocen específicamente las células objetivo y aumentan la producción de IFN γ .

5 Descripción de la invención

A continuación, se describirán realizaciones de la invención con referencia a figuras y tablas. El alcance técnico de la invención no está limitado por estas realizaciones y se puede implementar de diversas formas sin cambiar el resumen de la invención.

En la memoria descriptiva, el término "anticuerpo", o "fragmento de unión a antígeno", se refiere a una proteína de unión a antígeno en el sistema inmunitario. Un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno es una glicoproteína que comprende dos cadenas pesadas (cadenas H) y dos cadenas ligeras (cadenas L) unidas entre sí por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada incluye una región variable (VH) y una región constante (CH). La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera incluye una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera (CL). VL se compone del dominio CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones determinantes de complementariedad (CDR) con hipervariabilidad y regiones marco conservadas (FR) con cierta extensión de secuencia conservada. En VH y VL, se disponen del extremo amino al extremo carboxilo FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4, es decir, tres CDR y cuatro FR, respectivamente. Para la unión al antígeno, se sabe que CDR3 es importante. Tanto VH como VL comprenden dominios de unión que interactúan con un antígeno.

En la memoria descriptiva, el término "HLA" es Antígeno Leucocitario Humano (antígeno leucocitario humano), que significa el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano y un complejo de genes que codifican moléculas de superficie celular que son necesarias para la presentación de antígenos a las células inmunitarias. HLA se puede clasificar en clase I y clase II. El HLA de clase I se compone de cadena α y microglobulina β 2. El HLA de clase I se expresa en casi todas las células nucleadas y actúa en la presentación de antígenos a linfocitos T positivos para CD8. El HLA de clase I se puede clasificar en HLA-A, HLA-B y HLA-C.

En la memoria descriptiva, la expresión "receptor de antígeno quimérico (CAR)" significa la proteína de fusión que contiene un dominio extracelular que se une a un antígeno, un dominio transmembrana diferente del dominio extracelular y al menos uno de un dominio intracelular. CAR se puede denominar "receptor quimérico", "cuerpo-T" o "receptor inmunitario quimérico (CIR)". "Dominio extracelular que se une a un antígeno" significa cualquier oligopéptido o polipéptido que se une a un antígeno, "dominio intracelular" significa cualquier oligopéptido o polipéptido que se sabe que actúa como un dominio para una señal de transmisión que activa o inhibe un proceso biológico en una célula.

En la memoria descriptiva, "proteína de unión a antígeno" significa una parte del anticuerpo que se une a un antígeno o un fragmento de anticuerpo que confiere especificidad al anticuerpo por el antígeno.

A continuación, la invención se describirá específicamente.

(1) Fragmento de unión a antígeno y ácido nucleico que lo codifica de la invención

El anticuerpo anti-complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2 (HLA-A2-MAGE-A4) es el anticuerpo que reconoce específicamente y se une al complejo de HLA-A2 y P230-239 (SEQ ID NO: 1) que es un péptido derivado de MAGE-A4 restringido por HLA-A2. El anticuerpo de la invención es altamente específico, no se une al complejo de HLA-A2 y un péptido distinto de P230-239, y al complejo de péptido P230-239 y un HLA distinto de HLA-A2 (o actividad de unión muy baja). Por lo tanto, el fragmento de unión a antígeno de la invención se puede detectar o dirigir específicamente al complejo HLA-A2-MAGE-A4.

El fragmento de unión a antígeno de la invención contiene (A) el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de VH (región variable de cadena pesada) de SEQ ID NO: 36 y la secuencia de aminoácidos de VL (región variable de cadena ligera) de SEQ ID NO: 38, o (B) el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de VH (región variable de cadena pesada) de homología de secuencia de aminoácidos del 90 % o más de SEQ ID NO: 36, y la secuencia de aminoácidos de VL (región variable de cadena ligera) región) de homología de secuencia de aminoácidos del 90 % o más de SEQ ID NO: 38. El fragmento de unión a antígeno de la invención puede contener (C) el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de sc (cadena sencilla) de SEQ ID NO: 37 o (D) el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de sc (cadena sencilla) de homología de secuencia de aminoácidos del 90 % o más de SEQ ID NO: 37 entre VH y VL.

El fragmento de unión a antígeno incluye uno o más fragmentos que se unen específicamente a un antígeno. El fragmento de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno del anticuerpo reconoce específicamente el antígeno de manera similar al anticuerpo de longitud completa. En los fragmentos de unión a antígeno que contienen anticuerpos y fragmentos de los mismos se ejemplifican Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y Fv monocatenario (scFv). Fab es un fragmento de anticuerpo monovalente constituido por VL, VH, CL y dominio CH1. Fab' es un fragmento de anticuerpo monovalente constituido por VL, VH, CL, dominio CH1 y región bisagra. El F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo

divalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por enlaces disulfuro de la región bisagra. Fv es un fragmento de anticuerpo monovalente constituido por de VL y VH. Los dominios VL y VH del fragmento Fv están codificados por genes separados, scFv, que es una proteína de una molécula, se puede producir mediante técnicas de recombinación génica combinando dos genes con un enlazador. scFv contiene un enlazador (cadena sencilla) entre VH y VL. La sc
 5 conecta VH y VL, y es un péptido que se usa normalmente en el campo técnico para estabilizar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo de scFv (por ejemplo, Huston *et al.*, *Methods in Enzymology*, 203: 46-88 (1991), Whitlow *et al.*, *Protein Eng.*, 6: 989 (1993)). sc contiene generalmente glicina y serina, la longitud es de 15 a 18 aminoácidos.

Un aspecto de la presente invención comprende una combinación de un fragmento de unión a antígeno. Para dichas
 10 moléculas, se ejemplifican Fab3, Diacuerpo, Triacuerpo, Tetracuerpo, Minicuerpo, Bis-scFv, (scFv)₂-Fc, IgG inalterada (Holliger *et al.*, *Nature Biotechnology*, 23(9), págs. 1126-36 (2005)).

Se pueden modificar uno o varios aminoácidos de fragmentos de unión a antígeno, siempre que no afecte
 15 sustancialmente a sus propiedades. Por ejemplo, se puede sustituir, suprimir, añadir o insertar uno o varios aminoácidos en la región constante o región FR. La modificación se puede realizar fácilmente mediante la combinación de métodos conocidos que incluyen mutagénesis dirigida al sitio (mutación puntual introducida y mutagénesis de casete, etc.), un método de recombinación homóloga de genes, un método de extensión de cebadores y un método de PCR.

La invención comprende un ácido nucleico que codifica el fragmento de unión a antígeno. Adicionalmente, el ácido
 20 nucleico de la invención comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 31 y 33 a 35 en el listado de secuencias. El ácido nucleico se puede modificar a codones (codón óptimo) adecuados para células hospedadoras sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico. La eficacia de expresión de un polipéptido en una célula hospedadora se puede mejorar modificando a codones óptimos.

El fragmento de unión a antígeno de la invención se puede preparar usando técnicas de ingeniería genética conocidas
 25 o métodos de síntesis química. En la técnica de ingeniería genética, el polipéptido se puede producir preparando un vector de clonación o un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de la invención, introduciendo el vector en una célula hospedadora, cultivando células hospedadoras que expresan el ácido nucleico y recuperando el
 30 polipéptido mediante purificación. Cuando se incluye una pluralidad de ácidos nucleicos de la invención, en una célula hospedadora se puede introducir una combinación de una pluralidad de vectores que contienen cada molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora, o un vector que comprende una pluralidad de ácidos nucleicos. En la preparación del polipéptido, se une un marcador peptídico al polipéptido, que se puede recuperar y purificar usando el marcador peptídico.

Un vector de la invención se une operativamente a secuencias de control adecuadas para expresar los ácidos
 35 nucleicos en un hospedador adecuado. Dichas secuencias de control contienen un promotor para transcribir los ácidos nucleicos, una secuencia operadora para controlar la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma, un potenciador, una secuencia de poliadenilación y una secuencia para controlar la terminación de la
 40 transcripción y la traducción y similares. En el vector se pueden usar diversas secuencias conocidas (por ejemplo, un sitio de escisión de enzima de restricción, un gen marcador tal como un gen de resistencia a fármacos (gen de selección), una secuencia señal, una secuencia líder y similares). Se pueden seleccionar y usar diversas secuencias adecuadamente de acuerdo con el tipo de polipéptido expresado, la célula hospedadora, las condiciones del medio y similares.

En la invención se puede usar un vector que se incorpora en el genoma del hospedador, o que no se incorpora en el
 45 genoma del hospedador, y un vector episómico que existe en el citoplasma para replicarse de forma autónoma y similares. Como vector, se ejemplifica un vector retroviral (que contiene vectores oncorretrovirales, vectores lentivirus, vector pseudotipado), vector adenoviral, vector de virus adenoasociado (AAV), vector de virus de simio, vector de
 50 virus vaccinia, vector de virus Sendai, vector de virus Epstein-Barr (EBV), vector de VHS y similares. Como vector vírico, se puede usar preferentemente un virus que carezca de capacidad de replicación en las células infectadas. Adicionalmente, también se puede usar un vector no vírico mediante combinación con liposomas y un agente de condensación tal como lípidos catiónicos. Además, el ácido nucleico se puede introducir en las células mediante transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, bombardeo de partículas y similares.

Como células hospedadoras se pueden usar células conocidas. Por ejemplo, se ejemplifican células procariotas tales
 55 como *E. coli*, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (células CHO), células humanas, y células eucariotas tales como levaduras y células de insectos y similares.

El fragmento de unión a antígeno de la invención expresado en células hospedadoras, se puede purificar a partir del
 60 medio de la célula hospedadora, extractos y/o lisados de células hospedadoras. El método de purificación se puede realizar combinando métodos conocidos adecuados. Por ejemplo, se pueden usar adecuadamente la centrifugación, la cromatografía con hidroxipatita, la electroforesis en gel, la diálisis, el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC en fase inversa, la cromatografía con sílice, la cromatografía
 65 con sefrosa y heparina, la cromatografía con resina aniónica o catiónica (columna de ácido poliaspártico, etc.), el cromatoenfoco, la SDS-PAGE, la precipitación con sulfato de amonio y la cromatografía de afinidad.

(2) Una composición de la presente invención

En la invención, se proporciona una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención descrita en (1), así como una composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno.

El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención se puede usar como una sonda para el complejo de péptido derivado de MAGE-A4 y HLA-A2. Se sabe que MAGE-A4 se expresa dentro de las células cancerosas y es presentado por HLA, los linfocitos T atacan a las células cancerosas basándose en el reconocimiento de antígenos. Por lo tanto, el fragmento de unión a antígeno de la invención se puede usar como una sonda para células cancerosas, es decir, la composición de detección o diagnóstico.

Para dichos métodos de detección, se pueden ejemplificar métodos de detección conocidos, por ejemplo, ELISA, ensayo de anticuerpos fluorescentes, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayos de transferencia puntual, ensayo de inhibición o competencia, ensayo sándwich y ensayos de aglutinación de perlas de látex.

Las muestras para diagnóstico y detección contienen muestras biológicas (por ejemplo, tejidos del sitio de la enfermedad, células, fluido corporal que contiene sangre, suero, plasma, linfa y orina). Para estas muestras, el complejo antígeno-anticuerpo se detecta después de haberlo pre-purificado, homogeneizado, centrifugado o diluido en un tampón adecuado y, en caso necesario, haberlo puesto en contacto con el fragmento de unión a antígeno de la invención. En el caso, el fragmento de unión a antígeno de la invención se puede marcar o se puede usar un anticuerpo secundario marcado. Para el marcador, se puede usar una enzima (tal como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, etc.), isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I , etc.), sustancias fluorescentes (por ejemplo, rodamina, fluorescamina, cloruro de dansilo y sus derivados, etc.) y péptidos marcadores y similares.

El fragmento de unión a antígeno de la invención se puede usar para suministrar una composición farmacéutica a una diana. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención unido a productos farmacéuticos reconoce específicamente el péptido WT1 y el complejo HLA-A24. Para la composición farmacéutica para el suministro a una diana, se ejemplifican citocinas (IL2, TNF, IFN- γ , etc.), proteínas receptoras de las mismas, citotoxinas (ricina, difteria, gelonina, etc.), isótopos radiactivos (^{90}Y , ^{131}I , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{223}Ra y ^{227}Th etc.), células (linfocitos T, linfocitos NK, etc.) o compuestos de bajo peso molecular (caliqueamicina, doxorubicina, etc.).

Las cantidades eficaces de los principios activos de la composición farmacéutica de la invención se determinan adecuadamente basándose en el propósito, el tipo de tumor, las condiciones médicas tales como el sitio enfermo y el tamaño de la afección del paciente, y la vía de administración y similares. Cuando se usa como composición farmacéutica, además del principio activo pueden añadirse diversos componentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, portador, excipiente, tampón, estabilizante, etc.). La composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de un comprimido, líquido, polvo, gel, pulverización, una microcápsula, sistema de distribución coloidal (liposomas, microemulsiones, etc.) y macroemulsión y similares basándose en las condiciones. Como vía de administración de la composición farmacéutica, se ejemplifica la inyección intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intramuscular, intraocular, intraarterial, biliar e intralesional, la infusión, la formulación de sistemas de liberación sostenida y similares. La composición farmacéutica se puede administrar mediante infusión continua o inyección.

La composición farmacéutica de la invención se puede usar para tratar tumores hematopoyéticos tales como la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfocítica aguda (LLA) y la leucemia mieloide aguda (LMA) y cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, mesotelioma y similares, y para el diagnóstico y detección de tumores y cánceres sólidos. En particular, es útil para el tratamiento, el diagnóstico y la detección de un tumor hematopoyético y un cáncer sólido positivos para MAGE-A4 o positivos para HLA-A2.

(3) Receptor de antígeno quimérico de la invención

La invención incluye un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende el fragmento de unión a antígeno en (1) y el dominio intracelular de la proteína de señalización. CAR reconoce específicamente el complejo HLA-A2-péptido derivado de MAGE-A4 y se une a él, y puede transmitir una señal a las células que expresan CAR. CAR comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El fragmento de unión a antígeno de la presente invención está contenido en el dominio extracelular. Cuando el dominio extracelular se une específicamente al complejo HLA-A2-MAGE-A4, se transmite una señal al interior de la célula a través del dominio intracelular de CAR, que estimula la célula que expresa CAR. Las células estimuladas producen citocinas y similares, presentan citotoxicidad para las células diana que expresan el complejo o inducen citotoxicidad de otras células inmunitarias.

Como dominio intracelular de CAR, se puede usar un dominio que pueda transmitir una señal al interior de la célula, cuando el dominio extracelular de la molécula de CAR interactúa (se une) al complejo péptido derivado de MAGE-

- A4/HLA-A2. Como dichas proteínas de señalización, se ejemplifican proteínas de membrana, receptores de señal y receptores de citocinas. Para el dominio intracelular de CAR, se ejemplifican los dominios intracelulares que contienen una secuencia primaria de transmisión de señales citoplasmáticas derivada de CD3zeta (CD3ζ), FCRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a y CD66d. Adicionalmente, se ejemplifican los dominios intracelulares que contienen una secuencia secundaria de transmisión de señales citoplasmáticas (señales coestimuladoras) derivada de CD2, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD28, CD137 (también conocido como "4-1BB"), CD134, ICOS, GITR y CD154. Además, se ejemplifican los dominios intracelulares que contienen una secuencia terciaria de transmisión de señales citoplasmáticas derivada del receptor de IL-2 y el receptor de IL-21.
- 10 Como dominio transmembrana de CAR, se pueden usar la cadena alfa o la cadena beta del receptor de linfocitos T, el dominio transmembrana de la cadena zeta de CD3, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (también conocido como "4-1BB"), ICOS, CD154 y GITR, y similares. Se puede usar una secuencia diseñada artificialmente.
- 15 La invención comprende un ácido nucleico que codifica un CAR. El ácido nucleico que codifica un CAR puede conectarse con otro ácido nucleico para expresarse bajo el control de un promotor adecuado. Se puede usar un promotor que se exprese de manera constitutiva o se exprese de manera inducible por un fármaco (por ejemplo, tetraciclina o doxorrubicina). Por ejemplo, se pueden usar promotores derivados de mamíferos que contengan el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK), el promotor Xist, el promotor de la beta-actina y el promotor de la ARN polimerasa II, promotores derivados de virus que contengan el promotor temprano del SV40, el promotor del citomegalovirus, el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple, el promotor LTR de diversos retrovirus y similares. Para conseguir una transcripción eficiente del ácido nucleico, se puede unir al ácido nucleico otro elemento regulador que coopere con un promotor o un sitio de inicio de la transcripción (por ejemplo, una secuencia potenciadora o una secuencia terminadora). Además, se puede incorporar un gen marcador que se pueda usar para confirmar la expresión del ácido nucleico (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos, un gen que codifique una enzima indicadora o un gen que codifique una proteína fluorescente, etc.).
- 20 El ácido nucleico que codifica el CAR puede introducirse en las células mediante el vector. Además, el ácido nucleico que codifica el CAR se puede usar como principio activo de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR se puede preparar y usar basándose en la descripción de (2).
- 25 En otro aspecto de la invención, se incluye una célula que expresa el CAR. Las células se pueden preparar mediante el proceso de introducción del CAR de la invención en una célula. Cuando las células que expresan CAR se unen al complejo HLA-A2-MAGE-A4 a través de CAR, se transmite una señal a la célula y se activa. La activación de las células se puede confirmar mediante la liberación de citocinas, el aumento de la tasa de proliferación, el cambio de moléculas de superficie celular y similares, dependiendo del tipo de célula hospedadora y del dominio intracelular. Por ejemplo, la liberación de citocinas citotóxicas (factor de necrosis tumoral, linfotóxica, etc.) de las células activadas da como resultado la destrucción de las células tumorales que expresan el complejo. Adicionalmente, la liberación de citocinas y el cambio de las moléculas de la superficie celular estimulan otras células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos B, células dendríticas, linfocitos NK, macrófagos y similares. Por lo tanto, las células que expresan CAR son útiles para la inmunoterapia adoptiva, especialmente contra tumores o cánceres positivos para MAGE-A4 y positivos para HLA-A2.
- 35 El proceso de introducción del ácido nucleico que codifica el CAR en las células se realiza *in vitro* (*ex vivo*) o *in vivo*. Para las células introducidas por ácido nucleico, se pueden usar células de mamíferos tales como células derivadas de seres humanos y células derivadas de mamíferos no humanos que contengan mono, ratón, rata, cerdo, vaca y perro, etc. Para los tipos de células, por ejemplo, se pueden usar células procedentes de fluidos corporales tales como sangre (sangre periférica, sangre del cordón umbilical, etc.), médula ósea, tejido o un órgano, recogidas, aisladas, purificadas e inducidas. Se pueden usar PBMC, células inmunitarias (células dendríticas, linfocitos B, células madre hematopoyéticas, macrófagos, monocitos o linfocitos NK, células sanguíneas (neutrófilos, basófilos, monocitos), células madre hematopoyéticas, células mononucleares de sangre de cordón umbilical, blastos de fibrosis, preadipocitos, hepatocitos, células sanguíneas, queratinocitos de la piel, células madre mesenquimáticas, células madre hematopoyéticas, células madre adiposas, células madre pluripotentes, diversas estirpes celulares cancerosas o células madre neurales. En la invención, se usan preferentemente, en particular, linfocitos T, precursores de linfocitos T (células madre hematopoyéticas, células progenitoras linfoides, etc.), células madre pluripotentes o poblaciones celulares que las contienen. Los linfocitos T contienen linfocitos T positivos para CD8, linfocitos T positivos para CD4, linfocitos T reguladores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos infiltrantes de tumores. La población celular que contiene linfocitos T y células progenitoras de linfocitos T incluye PBMC. Las células utilizadas en la invención pueden ser cualquiera de las células muestreadas de un cuerpo vivo, las expandidas por cultivo y estirpes celulares. Cuando se puede esperar que las células transfectadas con un ácido nucleico o células diferenciadas a partir de las mismas se trasplantan a un cuerpo vivo, preferentemente se trasplantan células recogidas del cuerpo vivo o del mismo tipo de cuerpo vivo.
- 40 Para células que expresan el CAR de la presente invención, se puede realizar el cultivo y/o la estimulación con el medio de cultivo y/o las moléculas estimuladoras adecuados antes de la administración a un sujeto. Las moléculas

estimuladoras contienen citocinas, proteínas adecuadas y otros componentes. Como citocinas, por ejemplo, se ejemplifican IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IFN- γ y similares, preferentemente se ejemplifica IL-2. La concentración de IL-2 en el medio no está particularmente limitada, por ejemplo, es de 0,01 - 1×10^5 U/ml, preferentemente 1 - 1×10^4 U/ml. Además, se ejemplifican el ligando de CD3, el ligando de CD28 y el anticuerpo anti-IL-4. Además, se puede añadir un estimulador de linfocitos tal como lectinas. Además, se puede añadir suero o plasma al medio de cultivo. La cantidad de aditivos del medio no está particularmente limitada, se ejemplifica un 0 - 20 % en volumen, la cantidad de suero o plasma se puede cambiar de acuerdo con la fase de cultivo. La concentración de suero o plasma se puede disminuir gradualmente. El origen del suero o plasma puede ser el mismo que el propio (el mismo origen que las células cultivadas) o no ser el propio (diferente del origen de las células cultivadas), preferentemente se usan con seguridad los de origen propio.

El equipo de cultivo celular que se ha de usar para el cultivo celular no está particularmente limitado, por ejemplo, puede usarse una placa de Petri, un matraz, una bolsa, un baño de cultivo grande, se puede usar un biorreactor y similares. Como la bolsa, se puede usarse una bolsa permeable al gas CO₂ de cultivo celular. Cuando la masa de poblaciones celulares se produce industrialmente, se puede usar un baño de cultivo grande. Adicionalmente, el cultivo se puede realizar en un sistema abierto o en un sistema cerrado, el sistema cerrado se usa preferentemente para la seguridad de la población celular resultante.

La invención incluye una composición farmacéutica que contiene células que expresan el CAR como principio activo. La composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. Para la administración parenteral, se incluye la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea y similares. Para aumentar el efecto antitumoral, se puede usar administración al meningioma o al tejido cercano, por ejemplo, la administración subcutánea. La dosis de administración se selecciona adecuadamente dependiendo del estado del sujeto, el peso, la edad y similares. Por lo general, como el número de células, se administran 10^7 - 10^9 células por 60 kg de peso corporal por administración, preferentemente aproximadamente 5×10^7 - 5×10^8 células. La composición farmacéutica se puede administrar una o más veces. La composición farmacéutica puede estar en una forma adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, una inyección o infusión. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio o similar, con el fin de mantener las células de forma estable. El medio no está especialmente limitado, se ejemplifican en general medios tales como RPMI, AIM-V, X-Vivo 10 y similares.

Método de ensayo

1. Cribado de anticuerpos con fagoteca de anticuerpos humanos

(1) Preparación de perlas de pMHC

Se mezclaron 20 μ g de A2-MAGE-A4 como pMHC y 200 mg de perlas magnéticas unidas con Estreptavidina y se hicieron reaccionar a 4 °C en solución de Tween al 0,05 %/PBS(-). Se añadieron 3 μ l de biotina 2 mM/PBS(-) y la mezcla se hizo reaccionar durante 1 hora. La solución se lavó dos veces con Tween al 0,05 %/PBS(-) y se suspendió en 400 μ l de Tween al 0,05 %/PBS(-). La suspensión se usó como las perlas de antígeno.

(2) Biblioteca de anticuerpos humanos

Se amplificaron VH y VL mediante PCR a partir de amígdalas, sangre de cordón umbilical, sangre periférica y médula ósea de docenas de individuos sanos. Los productos de PCR se recombinaron con el vector fagémico pUC119, para preparar scFv con un repertorio de $3,4 \times 10^{12}$. El scFv se mostró en cp3 del fago M13. El producto se usa como biblioteca de anticuerpos humanos.

(3) Cribado usando una biblioteca de anticuerpos humanos, aislamiento de anticuerpos, preparación del sobrenadante de cultivo de cp3

Se preparó la mezcla de reacción que contenía $3,4 \times 10^{12}$ ufc de solución de biblioteca de anticuerpos humanos, 100 μ g de estreptavidina (Pierce), 30 μ g de tetrámero A2-CMV, 30 μ g de tetrámero A2-Foxp69, 30 μ g de tetrámero A2-IDOp41, 30 μ g de tetrámero A2-IDOp195, 20 μ g de protección Gamma, 100 μ l de solución de BSA al 2 %, 65 μ l de TritonX100 al 10 % y 1000 μ l de TritonX100 al 1 %/PBS y se mezcló y se rotó durante 1 hora a temperatura ambiente y se añadieron 100 μ l de solución de perlas magnéticas que se unió al tetrámero A2-MAGE-A4 y se mezclaron y rotaron durante 1 hora. Después, las perlas magnéticas se atraparon con Magnet Trapper (Toyobo), mientras se lavaba 5 veces con TritonX100 al 1 %/PBS. Las perlas magnéticas se añadieron a XL1-blue cultivado, infectado 1 hora a 37 °C, centrifugado y suspendido en 600 μ l de medio 2 $\times$ YTAG (ampicilina 200 μ g/ml, glucosa al 1 %/2 $\times$ YT). La suspensión se sembró en placa de agar YTAG (ampicilina 200 μ g/ml, agar glucosa al 2 %/nutriente (Nissui)) y se cultivó durante 15 horas a 37 °C. Se recogieron colonias con 30 ml de medio 2 $\times$ YTAG, se añadieron 200 μ l de la solución recogida a 20 ml de medio YTAG 2 $\times$ y se añadieron 30 μ l de fago auxiliar VCSM. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C para la infección y se incubó durante 90 minutos a 37 °C. Se añadieron 80 ml de medio 2 $\times$ YTAG, 60 μ l de kanamicina 50 μ g/ml y 50 μ l de IPTG 1 M a la mezcla cultivada y se incubaron durante 20 horas a

28 °C. Después de centrifugar la mezcla incubada, el sobrenadante se mezcló con 25 ml de solución de PEG (PEG N.º 600 al 20 %, NaCl 2,5 M). El precipitado se recogió mediante centrifugación, se suspendió en 1 ml de PBS y se esterilizó con filtro. La operación se repitió dos veces. Las *E. coli* recuperadas se sembraron en medio de agar YTAG. Después de incubarlas a 30 °C, las colonias se recogieron y se cultivaron en medio LB a 30 °C durante la noche. El ADN se extrajo con el kit de ADN Miniprep (QIAGEN) usando una porción del medio LB cultivado y se secuenció. Después, se mezclaron 50 µl del cultivo con 1,5 ml de 2×YTAI (medio 2×YT que contenía 0,5 mM de IPTG) y se cultivaron a 30 °C durante la noche. El sobrenadante se separó mediante centrifugación. El sobrenadante se usó como sobrenadante de cp3. Se realizó un ELISA usando el sobrenadante de cp3.

10 2. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

(1) Complejo MHC-péptido (monómero)

15 El complejo en el que HLA-A*0201 se unió a MAGE-A4 p230, MAGE-A4 P286, MAGE-A3 P195, CMV, MelanA, GP3, HTLV-1, NY-ESO-1 p157, NY-ESO-1 p159, Foxp3 p69, Foxp3 p127, Foxp3 p390, IDO p41, IDO p41, IDO p195 e IDO p199 se usó como complejo MHC-péptido.

(2) Inmovilización de pMHC

20 Se suspendieron 500 ng de neutraavidina (PIERCE Co.) en 50 µl de PBS en Maxisorp suelto (Nunc) y se agitaron a 4 °C durante la noche. Después de desechar la solución, se añadieron 200 µl de BSA/PBS al 2 % y la solución se colocó y bloqueó durante la noche. Después de desechar la solución, se añadieron 300 ng de monómero de HLA-A2-MAGE-A4 en 50 µl de PBS y la mezcla se agitó a 4 °C durante la noche. La solución se lavó con PBS.

25 La inmovilización de HLA-A2-CMV como control negativo se realizó de la misma manera.

(3) Medición de la reacción de ELISA

30 Se vertieron 100 µl de sobrenadante de cultivo de cp3 en el pocillo de la placa de antígeno inmovilizado, después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, el pocillo de la placa se lavó con PBS, se vertieron 100 µl de anticuerpo anti-cp3 de conejo diluido 2000 veces con Tween20 al 0,05 %/PBS en el pocillo y la placa se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar el pocillo con PBS, se vertieron en el pocillo 100 µl de anti-IgG de conejo marcado con HRP (MBL Co., Ltd.) diluido 4000 veces en Tween20 al 0,05 %/PBS, y la placa se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar el pocillo con PBS, se vertió OPD (WAKO Co., Ltd.) suspendida en H₂O₂ al 0,01 %, Na₂PO₄ 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M (pH 5,1) y se hizo reaccionar, después de confirmar el desarrollo de color, se añadió H₂SO₄ 2 N para detener la reacción. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 490 nm en SpectraMaxM2 (dispositivos moleculares).

40 3. Purificación del anticuerpo

(1) Transfección al vector para la purificación

45 El gen del anticuerpo se transfirió al vector de expresión His/FLAG para cambiar a la forma de scFv-FLAG/His. Se usó marcador FLAG para la detección mediante FACS, se usó marcador de His para la purificación por columna, respectivamente.

(2) Transformación

50 Después de que el ADN clonado del anticuerpo aislado se hiciese reaccionar por Sail (Takara Bio Inc.), el fragmento de ADN se hizo reaccionar con el vector mediante la ADN ligasa T4. Se transformaron células competentes DH5α (TOYOBO Co. Ltd.) mediante el ADN y se sembraron en placas de LBGA. Después de incubar a 30 °C durante la noche, las colonias se cultivaron en 2 × YTAG y parte de la solución de cultivo se cultivó en 2 × YTAI, el sobrenadante se separó mediante centrifugación.

55 (3) Confirmación de expresión de scFv-FLAG/His

60 Después de verter 100 µl de sobrenadante de cultivo en un pocillo de placa de antígeno, se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y el pocillo se lavó con PBS. Para la confirmación de la expresión del marcador de His, se vertió anti-His marcado con HRP (MBL Co., Ltd.) diluido 4000 veces en Tween20 al 0,05 %/PBS y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la confirmación de la expresión del marcador FLAG, se hicieron reaccionar en el orden el anticuerpo anti-FLAG(DDDK) y el anticuerpo marcado con HRP.

65 Después de que la placa de antígeno se lavase con PBS, se vertió OPD (WAKO Co., Ltd.) suspendida en H₂O₂ al 0,01 %, Na₂PO₄ 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M (pH 5,1) y se hizo reaccionar, después de confirmar el desarrollo de color, se añadió H₂SO₄ 2 N para detener la reacción. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 490 nm en SpectraMaxM2 (dispositivos moleculares).

(4) Purificación en bruto del anticuerpo

Se pusieron 2 ml de solución bacteriana precultivada en 100 ml de 2 × YTAI y se cultivaron a 30 °C durante la noche. La solución se centrifugó (8000 rpm, 10 min, 4 °C), el sobrenadante se recogió, se añadieron 100 ml de ácido sulfúrico saturado al sobrenadante y la mezcla se agitó. La solución se centrifugó (8000 rpm, 20 min, 4 °C) y el precipitado se suspendió en 10,5 ml de PBS completo. Después de centrifugar el PBS completo (12000 rpm, 1h, 4 °C), se añadió al sobrenadante 1 ml de Ni Sepharose excel (GE Healthcare) equilibrada con PBS y la mezcla se incubó a 4 °C durante la noche. Se llenó una columna con la muestra, se lavó con NaCl PBS 0,5 M que contenía NaCl PBS 0,5 M e imidazol 20 mM, y se eluyó con NaCl PBS 0,5 M que contenía imidazol 250 mM. El eluyente se dializó contra PBS, después de la diálisis, se concentró con Amicon Ultra 10K (Millipore). Se realizó una SDS-PAGE con una parte de la muestra, para confirmar la banda mediante tinción con CBB, para determinar la concentración de proteína del anticuerpo purificado en bruto.

(5) Purificación de la proteína con marcador de His usando AKTA Prime plus

El anticuerpo en bruto se purificó adicionalmente usando la columna HisTRAP de AKTA Prime plus (GE Healthcare). El procedimiento se realizó de acuerdo con el protocolo de purificación de marcadores de His adjunto. Las fracciones de pico recuperadas se detectaron mediante SDS-PAGE.

4. Medición de la constante de disociación (valor de KD)

Los valores de KD de los anticuerpos purificados se midieron con BiacoreX100 (GE Healthcare). La inmovilización de los ligandos se realizó con el kit de captura Biotin (GE Healthcare). (1) Inmovilización del ligando

(1) Inmovilización del ligando

Se inmovilizó HLA-A2-MAGE-A4 p230 en el chip sensor CAP. La concentración se ajustó a 200 nM con tampón HBS y el ligando se inmovilizó como UR (unidad de resonancia) adecuada.

(2) Preparación de la solución de analito

El anticuerpo purificado se ajustó a 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM y 200 nM con EP de HBS + tampón.

(3) Medición de los valores de KD

La reacción de unión se midió durante 180 segundos mientras la solución de analito fluía a través de la celda de flujo del chip sensor. Después de la medición, la solución de analito se cambió a tampón de HBS y la reacción de disociación se midió durante 300 segundos. La medición se realizó usando un método de ciclo único del programa para hacer fluir de forma continua el analito de baja concentración a alta concentración.

Después de que las reacciones hubieran terminado con todas las concentraciones, se calculó la constante de unión usando el programa de ajuste de curvas.

5. Análisis por citometría de flujo (FACS)

(1) Equipos

Se usaron FACS Calibur/FACS Cant/FACS CantII (BD) para medir el citómetro de flujo.

(2) Anticuerpo marcado con fluorescencia

Se usaron anticuerpos marcados con fluorescencia como se describe en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Marcador fluorescente	Antígeno	ID del clon	Empresa
FITC	CD8	HIT8a	BD bioscience
APC	CD4	RPA-T4	Biolegend
APC	CD8	RPA-T8	Biolegend

(continuación)

Marcador fluorescente	Antígeno	ID del clon	Empresa
APC	107a	H4A3	Biolegend
APC-Cy7	CD4	RPA-T4	Biolegend
APC-Cy7	CD8	RPA-T8	Biolegend
perCP-Cy5.5	CD8	RPA-T8	Biolegend
PE-Cy7	TNF- α	MAB11	eBioscience
V450	IFN- γ	4S.B3	eBioscience

(3) Tetrámero PE

- 5 Tetrámero PE significa la estreptavidina-PE a la que se unen cuatro monómeros biotinilados. El tetrámero PE se usó para la detección de linfocitos T específicos de antígeno. Los tetrámeros utilizados en la memoria descriptiva fueron el tetrámero A2-MAGE-A4 p230 y el tetrámero A2-NY-ESO-1 p157.

6. Ensayo de estabilidad de HLA y ensayo de unión de scFv

(1) Célula T2 (estirpe celular linfoblastoide híbrida BT humana HLA-A*02*)

La célula T2 es un tipo de estirpe celular que carece de transportador asociado a procesamiento de antígeno s(TAP), tiene una especificidad por la que la proteína intracelular no se presenta a HLA.

(2) Pulso de péptido a células T2

Se añadió péptido a una concentración final de 10 μ M a células T2 en RPMI1640 humano, se colocaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió RPMI1640 humano con FCS al 20 % hasta a concentración final de FCS al 10 %. Las células se incubaron en incubadora de CO₂ durante 45 min a 37 °C. Después de dos lavados, las células se usaron para el ensayo.

(3) Ensayo de estabilidad de HLA

Se hizo reaccionar anti-HLA-A2 Alexa Fluor 488 con células T2 pulsadas con péptido durante 1 hora, la cantidad de HLA estabilizado en la superficie de los linfocitos T se determinó mediante detección con FACS.

(4) Ensayo de unión a scFv

Las células T2 pulsadas con péptido se hicieron reaccionar con anticuerpos adquiridos durante 1 hora, con anticuerpo anti-FLAG durante 1 hora, con anticuerpo anti-FITC de ratón durante 1 hora y se detectaron con FACS.

(5) Péptidos sustituidos con un aminoácido y péptido de riesgo

Como se muestra en la Tabla 2, se sintetizaron péptidos de un aminoácido sustituido en donde uno de los 10 aminoácidos de MAGE-A4p230-239 se sustituyó con alanina (A), metionina (M), fenilalanina (F) y triptófano (W) y se examinó la CI50 de cada péptido. Cada péptido se ajustó a una concentración final de 10 mM en DMSO.

CI50 de MHC es el valor teórico calculado por IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/processing/>), y cuando el valor es menor, indica que el enlace entre HLA-A*0201 y el péptido es más fuerte.

La Tabla 2 muestra la secuencia de aminoácidos de los péptidos sustituidos con un aminoácido y la CI50.

[Tabla 2]

I.D.	Secuencia de aminoácidos	CI50(nM) de MHC
MAGE-A4p230-239 (SEQ ID NO: 1)	GVYDGREHTV	225,4
1A(SEQ ID NO: 2)	AVYDGREHTV	118,1
2A(SEQ ID NO: 3)	GAYDGREHTV	2482,2
3A(SEQ ID NO: 4)	GVADGREHTV	1139,1
4A(SEQ ID NO: 5)	GVYAGREHTV	437,6
5A(SEQ ID NO: 6)	GVYDAREHTV	330,9
6A(SEQ ID NO: 7)	GVYDGAHTV	75,0
7A(SEQ ID NO: 8)	GVYDGRAHTV	108,9
8A(SEQ ID NO: 9)	GVYDGREHTV	289,1
9A(SEQ ID NO: 10)	GVYDGREHAV	197,0
10A(SEQ ID NO: 11)	GVYDGREHTA	2323,2
2,10A(SEQ ID NO: 12)	GAYDGREHTA	10668,2
3M(SEQ ID NO: 13)	GVMDGREHTV	148,6

(continuación)

I.D.	Secuencia de aminoácidos	CI50(nM) de MHC
3F(SEQ ID NO: 14)	GVFDGREHTV	169,8
5F(SEQ ID NO: 15)	GVYDFREHTV	119,8
5W(SEQ ID NO: 16)	GVYDWREHTV	119,8
A2-CMV		21,29

La Tabla 3 muestra la secuencia de aminoácidos de los péptidos de riesgo y los valores de CI50 que se extrajeron del péptido de la familia MAGE y el aminoácido que reconoce el anticuerpo MAGE n.º 17 mediante búsqueda BLAST.

5

[Tabla 3]

Péptido de riesgo	Secuencia de aminoácidos	CI50(nM) de MHC
MAGE-A4 (SEQ ID NO: 1)	GVYDGREHTV	225,4
MAGE-A1 (SEQ ID NO: 17)	EVYDGREHSA	13523,5
MAGE-A8 (SEQ ID NO: 18)	GLYDGREHSV	9,7
MAGE-A9 (SEQ ID NO: 19)	GVYVGKEHMF	35519,6
MAGE-A10 (SEQ ID NO: 20)	GLYDGREHLI	35,4
MAGE-A11 (SEQ ID NO: 21)	GVYAGREHFL	736,5
MAGE-B2 (SEQ ID NO: 22)	GVYDGEEHSV	110,5
MAGE-B10 (SEQ ID NO: 23)	GLYDGIEHFM	10,2
MAGE-C2 (SEQ ID NO: 24)	GVYAGREHFV	156,2
ADAMTS (SEQ ID NO: 25)	HVYNGRTHQW	36230,3
RBBP5 (SEQ ID NO: 26)	RVYDGREILT	5880,0
Calcifosina (SEQ ID NO: 27)	GVYSGRAHPK	35865,8

7. Construcción de construcción de CAR y vector

10 (1) CAR 28z de MAGE n.º 17

La Figura 1 muestra la imagen de secuencia de la construcción de CAR. La construcción contiene Líder, VH, VL, CL, CD28TM, CD28ICD (dominio intracelular de CD28) y cadenas CD3zeta (CD3ζ) del extremo 5'. VH y VL es scFv de MAGE n.º 17 en estas cadenas.

15

(2) Construcción de CAR

La Figura 2 muestra esquemáticamente las etapas de construcción de CAR. Para explicar cada etapa es como sigue.

20 En primer lugar, la reacción de PCR se realizó usando scFv-cp3 como molde, en donde se añadieron Líder con sitio de reconocimiento EcoRI en el extremo 5' de la VH-VL y CL con sitio de reconocimiento Ascl en el extremo 3', respectivamente. A continuación, el fragmento del producto de PCR tratado con EcoRI y Ascl, y el fragmento del vector de CAR 28z tratado con EcoRI y Ascl se hicieron reaccionar con ligasa para obtener CAR 28z.

25 8. Preparación de linfocitos humanos

Se prepararon linfocitos humanos a partir de sangre de donantes sanos usando Ficoll-Paque™ PLUS (17-1440-03, GE Healthcare). Se obtuvieron separando PBMC (células mononucleares de sangre periférica). La recogida de muestras de sangre que contenían sangre periférica humana utilizada en el estudio y el análisis se realizaron de conformidad con la Declaración de Helsinki, de acuerdo con el protocolo que fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Mie con el consentimiento por escrito de los sujetos.

35 Las muestras recogidas se almacenaron en un frigorífico o un tanque de nitrógeno líquido que se había cifrado para no identificar a los sujetos y el tratamiento antirrobo. La información personal de los sujetos era anónima y se prestó mucha atención a la privacidad personal y a los resultados del análisis genético para no que no se filtrasen al exterior.

9. Introducción de ARNm en células mediante electroporación

(1) Preparación del ARNm

40

Se cortó ADN de CAR en una sola cadena para producir un molde de ADN lineal. El ADN se purificó usando Wizard SV Gel y PCR Clean-UP System (Promega). El ARNm se preparó a partir del ADN purificado usando el kit mMESSAGEmMACHINE T7 Ultra (Life technologies).

45 (2) Comprobación mediante el bioanalizador

El bioanalyzer (Agilent Technologies) confirmó la adición de poli A al ARNm.

(3) Preparación de la placa de cultivo de PBMC

El anticuerpo anti-CD3 (OKT-3 eBioscience) se diluyó con una solución de ACD-A (TERUMO) a una concentración final de 5 pg/ml, se diluyó RetroNectin (Takara Bio) con una solución de ACD-A a una concentración final de 25 µg/ml, se vertieron 400 pl de dos soluciones en cada pocillo de una placa de 12 pocillos (Nunc) y se incubaron durante 5-10 horas a 37 °C en incubadora de CO₂.

(4) Preparación de CM (medio de cultivo)

Se preparó un cultivo de PBMC que contenía 50 ml de medio de linfocitos GT-T503, 50 µl de IL-2 humana (600 UI), 400 pl de albúmina (HSA al 25 %) y 300 pl de plasma del donante de linfocitos.

(5) Aislamiento y cultivo de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica se separaron de la sangre humana sana (células mononucleares de sangre periférica, PBMC) mediante Ficoll y se suspendieron a 2×10^5 células/ml por CM, se vertieron 2,5 ml de la suspensión en una placa y se cultivaron durante 4 días a 37 °C en incubadora de CO₂.

(6) Electroporación

El ARNm producido se introdujo en PBMC después de 10 días desde la separación mediante electroporación. Las PBMC introducidas se usaron en el ensayo en 24 horas.

10. Transferencia génica a células por retrovirus (experimento de infección)

(1) Preparación de retrovirus mediante célula de empaquetamiento Plat-A

El gen CAR se introdujo en la célula de empaquetamiento plat-A usando FuGENE (Promega), después se incubó durante dos días, el sobrenadante se recuperó y se usó como solución de virus.

(2) Aislamiento y cultivo de PBMC

El aislamiento y el cultivo de PBMC se realizaron de acuerdo con el punto 9 anterior. (3)-(5).

(3) Producción de placa para infección por retrovirus

Se diluyó RetroNectin con solución de ACD-A a una concentración final de 20 pg/ml. Se vertieron 500 pl de la solución en cada pocillo de la placa de 24 pocillos y se almacenaron a 4 °C durante la noche. Antes de verter la solución de virus, la placa se lavó dos veces con ACD-A.

(4) Preparación de la placa de retrovirus para la infección, infección a las células

La solución de virus preparada en el punto 10.(1) anterior se vertió en una placa de infección por retrovirus en 1 ml, la placa se centrifugó a 2000×g durante 2 horas a 32 °C para recubrir la placa con virus. La placa se lavó dos veces con Alubuminar/PBS al 1,5 %.

(5) Infección por retrovirus en PBMC, preparación de linfocitos T-CAR

Se recuperaron PBMC cultivadas en el punto 10.(2) anterior, después de diluir por CM a 4×10^5 , se sembraron 950 pl de la suspensión en la placa para la infección por retrovirus, después la placa se centrifugó a 1000×g durante 10 minutos a 32 °C y se incubó a 37 °C en incubadora de CO₂.

El linfocito T-CAR preparado se usó en el ensayo después de 12-14 días desde la separación de las PBMC.

(6) Preparación de la célula de control

Parte de las células cultivadas en el punto 10.(2) anterior se usó como células de control (sin operación de transfección génica).

11. Características de las estirpes celulares tumorales utilizadas en experimentos *in vitro*

Las características de las estirpes celulares utilizadas en experimentos *in vitro* se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Estirpe celular	A2	A24	MAGE-A4
NW-MEL-38	+	-	6,01E+03 (+)

LB-23	+	+	1,95E+03 (+)
LC-1/sq	-	+	1,61E+03 (+)
MEL72	+	+	4,00E-01 (-)
HCT116	+	-	-
T2	+	-	-
SK-MEL-37	+	-	+

12. Ensayo de liberación de IF- γ

La concentración de IF- γ en cultivo se determinó usando el kit de eBioscience mediante ELISA.

5

Se diluyó 10 $\times$ tampón de recubrimiento 10 veces con agua purificada para preparar el tampón de recubrimiento. Se añadieron 48 μ l del anticuerpo primario a 12 ml de tampón de recubrimiento. El tampón se añadió a la placa de fondo plano de 96 pocillos a 100 μ l por pocillo. Después, la placa se almacenó a 4 $^{\circ}$ C durante la noche, se lavó cinco veces con PBS-T al 0,05 %. 5 $\times$ diluyentes de ensayo se diluyeron 5 veces con agua purificada para preparar diluyentes de ensayo. Los diluyentes de ensayo se añadieron a 200 μ l por pocillo. Después de 1 hora a temperatura ambiente para el bloqueo, la placa se lavó 5 veces con PBS-T al 0,05 %. Se preparó IFN- γ a 1000 pg/ml con *maxima*, se diluyó en 7 fases dos veces para preparar patrones. Se añadieron muestras y patrones a la placa y se hicieron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente, y la placa se lavó 5 veces con PBS-T al 0,05 %. Se añadieron 48 μ l del anticuerpo secundario a 12 ml de diluyentes de ensayo, los diluyentes se añadieron a 100 μ l por pocillo. Después, la placa se almacenó durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó cinco veces con PBS-T al 0,05 %. Se añadieron 48 μ l de estreptavidina-HRP a 12 ml de diluyentes de ensayo, la solución se añadió a 100 μ l por pocillo. La placa se hizo reaccionar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó siete veces con PBS-T al 0,05 %. La solución de sustrato de TMB se añadió a 100 μ l, reaccionando en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 50 μ l de H₂SO₄ 0,18 M para detener la reacción. Inmediatamente, la placa se midió a una longitud de onda de 450 nm con un lector de microplacas modelo 680 (Bio-Rad).

10

15

20

13. Tinción intracelular de citocinas (ICS)

Las células diana se ajustaron a 1×10^5 células/ml, las células efectoras se ajustaron a 1×10^5 células/ml. Se añadieron 0,5 μ l de APC Anti-CD107 humano por muestra, se añadieron células diana y células efectoras en una relación de 1:1 en una placa de 96 pocillos (U), se cocultivaron durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. Después, se añadieron 0,7 μ l de GolgiStop (inhibidor del transporte de proteínas) a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas a 37 $^{\circ}$ C. Las células de cada pocillo se transfirieron a una placa de 96 pocillos de tipo V, después de centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 $^{\circ}$ C, después se lavaron dos veces con BSA al 0,5 %/PBS. Se añadieron 0,5 μ l de APC-cy7 anti-CD4 humano y 0,5 μ l de FITC anti-CD8 humano a cada pocillo, y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos en la oscuridad, y la placa se lavó dos veces con BSA al 0,5 %/PBS. Se añadieron 100 μ l de solución fijadora celular (Cytfix/Cytoperm: BD), se mantuvieron en hielo durante 20 minutos en la oscuridad, se añadieron 100 μ l de perm/lavado (BD) y se centrifugaron. Después, la placa se lavó dos veces con solución de perm/lavado. Se añadieron 0,5 μ l de V450 IFN- γ y 0,5 μ l de PE-Cy7 TNF- α a cada pocillo. En condiciones de oscuridad, la placa se mantuvo en hielo durante 30 minutos, se lavó dos veces con BSA al 0,5 %/PBS. Posteriormente, la placa se midió con el citómetro de flujo FACSCanto II (BD) y los datos se analizaron con el software FACS Diva (BD).

25

30

35

14. Captación de péptidos largos mediante APC, Presentación cruzada

40 (1) Péptido largo de MAGE-A4

La secuencia de aminoácidos del péptido largo de MAGE-A4 era NYKRCPVIF GKASEGVYDG REHTVYGEPR KAETSYVKVL EHVVRVNARV RI (SEQ ID NO: 28), el peso molecular del péptido era 6006,811. El péptido largo se diseñó conectando el epítipo A24 MAGE-A4 143-151 (NYKRCPVI: SEQ ID NO: 29), el epítipo A2 MAGE-A4 230-239 (GVYDGREHTV: SEQ ID NO: 1) y un epítipo auxiliar (AETSYVKVLE HWRVNARV I: SEQ ID NO: 30).

45

(2) CHP-Péptidos largos

CHP-Péptidos largos significa que el péptido largo de MAGE-A4 se envolvió en nanogel de CHP formando un objeto como sistema de suministro de fármacos. Puede esperarse la inducción de inmunidad celular usando el objeto (Documento no de patente 5).

50

(3) Selección de perlas negativas para CD3

Se suspendieron 1×10^7 células de linfocitos humanos en 80 μ l de FCS al 2 %/PBS. A la suspensión, se le añadieron 20 μ l de Micro Perlas de CD3 (Miltenyi Biotec) y se mezclaron bien. Después de 15 minutos a 4 $^{\circ}$ C en protección contra la luz, la suspensión se lavó con 10 volúmenes de FCS al 2 %/PBS. Las células se suspendieron en 3 ml de FCS al 2 %/PBS para su uso como suspensión celular. La suspensión celular se aplicó a un separador de MACS equipado con una columna de MACS. Las fracciones que se pasaron a través de la columna fueron fracciones

55

negativas para CD3, utilizadas como APC.

15. Ensayo de citotoxicidad

5 (1) Ensayo de liberación de Cr

Después de que se recogieran las células diana mediante centrifugación, se suspendieron en FCS al 100 % a una concentración final de 1×10^6 células/50 μ l. A esto, se le añadieron 50 pCi ($3,7 \times 10^6$ Bq) de ^{51}Cr y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C en incubadora de CO_2 . La concentración de células efectoras se ajustó de acuerdo con la ratio E/T mediante FCS-RPMI1640 al 10 % y se sembró en una placa de 96 pocillos en forma de U. Después del cultivo, las células se lavaron tres veces con FCS-RPMI1640 al 10 %. Las células se suspendieron en FCS-RPMI1640 al 10 % a una concentración final de 1×10^5 células/ml, se sembraron a 1×10^4 células/100 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos en forma de U y se cultivaron durante 8 horas en una incubadora de CO_2 a 37 °C. Después del cultivo, la placa se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se transfirieron 30 μ l de sobrenadante a la placa para su lectura y se secaron al aire durante la noche. La cantidad de ^{51}Cr se determinó mediante contador de centelleo MicroBeta2 (Perkin Elmer). El cálculo de la actividad citotóxica se determinó mediante la siguiente ecuación. El valor de liberación máximo fue el valor medido cuando se añadieron 100 μ l de NP-40 al 1 %.

20 16. Experimento de modelo de tratamiento de cáncer *in vivo* usando ratón NOG

(1) Ratones utilizados

Se adquirieron ratones NOG (NOD/Shi-scid, IL-2RyKO Jic) en CLEA Japón, Inc. Los ratones hembra se usaron en el experimento a las 7-8 semanas de edad. La terapia de infusión de linfocitos T con animales de laboratorio y el estudio de la inmunoterapia génica fueron aprobados por el comité de experimentos de ADN recombinante de la Universidad de Mie, el Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Mie y el comité de investigación animal. Los ratones se criaron en el Centro de Ciencias de la Vida de la Universidad de Mie para la Investigación y el Apoyo de la Instalación de Investigación Animal.

30 (2) Implantación de tumor humano e irradiación corporal total (TBI)

Como pretratamiento, se realizó irradiación corporal total (TBI, por sus siglas en inglés) con 2,5 Gy a los ratones NOG el día antes de la infusión de células. El pretratamiento redujo el número de linfocitos en el receptor, para que los linfocitos del donante transfundidos se injertan fácilmente. Las linfocitos T-CAR y los linfocitos humanos para infusión fueron 1×10^7 células/animal. Las células se transfundieron desde la vena de la cola de ratones NOG. Se midió el peso corporal cada 2-3 días.

El trasplante de tumores en ratones NOG se realizó 7 días antes de la infusión de los linfocitos T-CAR, se inyectaron NW-MEL-38 (positivas para MAGE-A4 y positivas para A2) a $2,5 \times 10^6$ células/ratón en el lado derecho del ratón, se inyectaron HCT116 (negativas para MAGE-A4 y positivas para A2) a $2,5 \times 10^6$ células/ratón por vía subcutánea en el lado izquierdo del ratón. Los diámetros tumorales se midieron cada 2-3 días.

(3) Preparación de las células para infusión

45 Los linfocitos T-CAR para infusión se prepararon de acuerdo con el método de "10. Transferencia génica a células por retrovirus" anterior.

(4) Aislamiento de PBMC en sangre periférica de ratón mediante muestreo de sangre orbital

50 Se recogió sangre periférica de la órbita del ratón, las PBMC se separaron usando Ficoll. Se tiñeron con tetrámero de A2-MAGE-A4, anticuerpo fluorescente CD4CD8 humano, y las células infundidas se confirmaron mediante FACS.

(5) Confirmación de TIL (linfocitos infiltrantes tumorales)

55 El tumor tomado del ratón se trituró, se tiñó con el anticuerpo fluorescente CD4CD8 humano tetrámero A2-MAGE-A4 y las células transfundidas se confirmaron mediante FACS.

(6) Inmunotinción

60 El tumor extirpado de ratón se congeló en nitrógeno líquido, se prepararon secciones congeladas mediante criostato. Estas secciones se tiñeron con DAPI, CD4-FITC humano y CD8-FITC humano, y se observaron con un microscopio de fluorescencia.

65 17. Experimentos *in vitro* con linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo zG y linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo 4-1BBz

Se confirmaron los efectos de los linfocitos T-CAR debido a las diferencias de la región de ICD. Específicamente, se produjeron CAR de tipo GTR (zG) y de tipo CD137 (4-1BBz) a partir de CAR de tipo CD28 (28z), se confirmaron los efectos de los mismos. Como se muestra en la Figura 21, se usó GTR (receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides) en lugar de CD28 como ICD en CAR zG. Asimismo, se usó CD137 (4-1BBz) en lugar de CD28

Como control, se usaron linfocitos T positivos para CD8 no transfectados con CAR (NGMC).

<Resultados>

1. Aislamiento y evaluación de anticuerpo que reconoce HLA-A2-MAGE-A4

Se sabe que MAGE-A4 (HLA-A2-MAGE-A4) se expresa altamente en el melanoma. Por lo tanto, se aisló una pluralidad de anticuerpos que reconocen MAGE-A4 mediante cribado usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Se usó el método de presentación en fagos para el aislamiento de anticuerpos. En el método, scFv se presenta como parte de una proteína de cubierta de fago cp3, los clones que se unen al antígeno con alta afinidad pueden seleccionarse mediante ELISA. Después de recoger aproximadamente 1500 clones, se realizó un ELISA en el estado de scFv-CP3. Se seleccionaron los clones que respondieron a HLA-A2-MAGE-A4 como diana positiva y los que no respondieron a A2-CMV como diana negativa. Para examinar la especificidad de unión de los anticuerpos seleccionados, el ELISA se realizó usando complejo de péptidos plurales-MHC (pMHC). Cada monómero de pMHC, que contenía HLA-A2-MAGE-A4 p230, MAGE-A4 p286, MAGE-A3 p195, CMV, MelanA, GP3, HTLV-1 p11, NY-ESO-1 p157, NY-ESO-1 p159, Foxp3 p69, Foxp3 p127, Foxp3 p390, IDO p41, IDO p41, IDO p195 e IDO p199, se inmovilizó, y el ELISA se realizó usando anticuerpos seleccionados. En la Fig. 3 se muestran algunos resultados del ELISA.

Se obtuvieron quince clones que mostraban una reacción específica a HLA-A2-MAGE-A4 después de comparar la secuencia de los clones que mostraban una unión fuerte a HLA-A2-MAGE-A4. Entre ellos, 5 clones que mostraban una unión fuerte, es decir, MAGE n.º 17, n.º 86, n.º 209, n.º 345 y n.º 672, se seleccionaron como clones candidatos y se procedió a los análisis.

A continuación, se midió el valor de KD del anticuerpo MAGE n.º 17 con BiacoreX100. La determinación del valor de KD por Biacore se determinó midiendo los cambios dinámicos en la sensibilidad de detección (resonancia, que refleja el cambio en la masa en el chip) a lo largo del tiempo. La constante de velocidad de disociación (Kd) y la constante de velocidad de unión (Ka) se determinaron mediante la curva de cambio dinámico, la constante de unión se determinó a partir de la relación de las dos constantes. Como resultado de la medición, la constante de unión de MAGE n.º 17 fue de 22 nM (Fig. 4).

2. Estudio sobre la especificidad de reconocimiento para el complejo A2-MAGE-A4 y el antígeno de riesgo de los anticuerpos obtenidos

La célula T2 carece de Transportador asociado al procesamiento de antígeno (TAP), no presenta la proteína intracelular a HLA. Cuando el péptido se pulsó a la célula T2, como HLA se estabilizó en T2, el nivel de expresión de HLA se confirmó mediante el uso de anticuerpos anti-HLA fluorescentes, con lo que se puede reconocer qué extensión de péptido se une a HLA.

Se hicieron reaccionar anticuerpos seleccionados, es decir, anti-MAGE n.º 17, n.º 86, n.º 209, n.º 345 y n.º 672 se hicieron reaccionar con células T2 pulsadas con MAGE-A4p230, CMV y DMSO, la cantidad de desplazamiento se determinó mediante FACS. Sólo en células T2 pulsadas con MAGE-A4 p230, los clones de anticuerpos seleccionados, MAGE n.º 17, n.º 86, n.º 209, n.º 345 y n.º 672 mostraron el cambio en la cantidad de desplazamiento (Figura 5).

A continuación, con el fin de buscar los aminoácidos que correlacionaban el reconocimiento de anticuerpos, se prepararon péptidos con una sustitución de aminoácido por otro aminoácido (principalmente alanina) de MAGE-A4 p230 (GVYDGREHTV: SEQ ID NO: 1), la fuerza de unión entre HLA-A*0201 y el péptido se examinó usando IEDB (Base de datos de epítomos inmunitarios) y se determinó la CI50 de MHC (Tabla 2). CI50 de MHC es el valor teórico calculado mediante la IEDB, cuando el valor es más bajo, el enlace con HLA-A* 0201 y el péptido es más fuerte. Los péptidos sustituidos con alanina se pulsaron a la célula T2, la cantidad de HLA en la superficie de la célula T2 se determinó mediante FACS (Figura 6). Al unirse un péptido más fuertemente a HLA, la estructura de péptido-HLA se estabilizó, puesto que la cantidad de desplazamiento de FACS aumentó, el valor de IFM fue un indicador de la fuerza de unión del péptido y HLA. Excepto en algunos de los péptidos, el valor de IFM y el valor de CI50 de MHC se correspondían entre sí.

Después, el péptido sustituido con alanina se pulsó a una célula T2 y se hizo reaccionar con MAGE n.º 17, se examinó el aminoácido implicado en el reconocimiento del anticuerpo (Fig. 7). Puesto que el valor de IFM cayó con 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A y 8A, se determinó que los siete aminoácidos estaban implicados en el reconocimiento. La secuencia de aminoácidos de GYDGRxHxx se realizó mediante búsqueda BLAST, se extrajo el péptido de riesgo (Tabla 3). Después de que la célula T2 se pulsara mediante el péptido de riesgo, la cantidad de HLA en la superficie de la célula T2 se determinó mediante FACS. De forma similar a los resultados mostrados en la Figura 6, el valor de IFM y el valor de CI50 de MHC de IFM se correspondían entre sí (Figura 8).

Después, la célula T2 se pulsó mediante el péptido de riesgo, reaccionó con MAGE n.º 17 y se confirmó que la célula T2 no reconoce el péptido de riesgo (Figura 9). Se practicaron ensayos similares usando otros clones n.º 86, n.º 209, n.º 345 y n.º 672, en los resultados, el clon n.º 17 tenía la mayoría de los aminoácidos implicados en el reconocimiento de antígenos. Por este motivo, MAGE n.º 17 resultó ser el candidato final.

Se mostró la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 31) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 32) de MAGE n.º 17.

10 Secuencia de nucleótidos de MAGE n.º 17 (SEQ ID NO: 31): CAGGTCCAGC TGGTACAGTC TGGGGCTGAG
GTGAAGAAGC CTGGGTCCTC GGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AGCTATGCTA
TCAGCTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTA TCTTTGGTAC
AGCAAACTAC GCACAGAAGT TCCAGGGCAG AGTCACGATT ACCGCGGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC
ATGGAGCTGA GCAGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGATCCCC CGGCGGGCAT
15 ATCATGATGC TTTTGATATC TGGGGCCAAG GGACAATGGT CACCGTCTCT TCAGGTGGAG GCGGTTGAGG
CGGAGGTGGC AGCGGCGGTG GCGGGAGTTC CTATGAGCTG ACTCAGCCAC CCTCGATGTC AGTGCCCCCA
GGAAAGACGG CCAGCATTAC CTGTGGCGGA GACCATATTG GAAGTAAAAG TGTTCACTGG TACCAGCAGA
AGCCAGGCCA GGCCCTGTA CTGGTCGTCT ATGATGATAG CGACCGGCC TCAGGGATCC CTGAGCGATT
CTCTGGCTCC AACTCTGGGA ACACAGCCAC TCTGACCATC AGCGGGACCC AGGCTATGGA TGAGGCTGAC
20 TATTACTGTC TGGCGTGGGA CAGCAGCACT GCGATCTTCG GCGGAGGGAC CAAGCTGACC GTCCTC.

La secuencia de aminoácidos de MAGE n.º 17 (SEQ ID NO: 32): QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS
SYAISWVRQA PGQGLEWMGG IPIFGTANY AQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSP
RRAYHDAFDI WGQGTMTVS SGGGSGGGG SGGGSSYEL TQPPMSVAP GKTASITCGG DHIGSKSVHW
25 YQQKPGQAPV LVVYDDSDRP SGIPERFSGS NSGNTATLTI SGTQAMDEAD YYCLAWDSST AIFGGGKLT VL.

Las secuencias anteriores muestran que la secuencia de nucleótidos contiene VH (SEQ ID NO: 33), sc (SEQ ID NO: 34) y VL (SEQ ID NO: 35), y la secuencia de aminoácidos contiene VH (SEQ ID NO: 36), sc (SEQ ID NO: 37) y VL (SEQ ID NO: 38), como se muestra a continuación.

30 La secuencia de nucleótidos de VH (SEQ ID NO 33): CAGGTCCAGC TGGTACAGTC TGGGGCTGAG
GTGAAGAAGC CTGGGTCCTC GGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AGCTATGCTA
TCAGCTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTA TCTTTGGTAC
AGCAAACTAC GCACAGAAGT TCCAGGGCAG AGTCACGATT ACCGCGGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC
35 ATGGAGCTGA GCAGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGATCCCC CGGCGGGCAT
ATCATGATGC TTTTGATATC TGGGGCCAAG GGACAATGGT CACCGTCTCT TCA.

La secuencia de nucleótidos de la región sc (SEQ ID NO 34): GGTGGAGGCG GTTCAGGCGG AGGTGGCAGC
GGCGGTGGCG GGAGTTCCTA T.

40 La secuencia de nucleótidos de la región VL (SEQ ID NO 35): GAGCTGACTC AGCCACCCTC GATGTCAGTG
GCCCCAGGAA AGACGGCCAG CATTACCTGT GCGGAGAGACC ATATTGGAAG TAAAGTGTT CACTGGTACC
AGCAGAAGCC AGGCCAGGCC CCTGTACTGG TCGTCTATGA TGATAGCGAC CGGCCCTCAG GGATCCCTGA
GCGATTCTCT GGCTCCAACCT CTGGGAACAC AGCCACTCTG ACCATCAGCG GGACCCAGGC TATGGATGAG
45 GCTGACTATT ACTGTCTGGC GTGGGACAGC AGCACTGCGA TCTTCGGCGG AGGGACCAAG CTGACCGTCC
TC.

La secuencia de aminoácidos de la región VH (SEQ ID NO 36): QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS
SYAISWVRQA PGQGLEWMGG IPIFGTANY AQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSP
50 RRAYHDAFDI WGQGTMTVS S.

La secuencia de aminoácidos de la región sc (SEQ ID NO: 37): GGGGSGGGGS GGGGSSY.

La secuencia de aminoácidos de la región VL (SEQ ID NO: 38): ELTQPPMSV APGKTASITC GGDHIGSKSV
55 HWYQQKPGQA PVLVVYDDSD RPSGIPERFS GSNSGNTATL TISGTQAMDE ADYYCLAWDS STAIFGGGK LTVL.

3. CAR de MAGE n.º 17 reconoce específicamente la célula cancerosa diana y la producción de IFN- γ ha aumentado

Puesto que se confirmó la especificidad del clon de anticuerpo MAGE n.º 17, MAGE n.º 17 se reemplazó por el vector de CAR. Después, después de preparar el ARNm, se confirmó mediante bioanalizador, El gen de CAR se introdujo en linfocitos de sangre periférica humana (PBMC) mediante el método de electroporación. Si el CAR introducido se expresaba normalmente o no se confirmó mediante tinción de tetrámero. Por consiguiente, la tasa positiva de CAR de linfocitos T-CAR fue del 98,8 % por CD8 y fue del 98,5 % por CD4 (Figura 10). Los linfocitos T-CAR y las células T2 pulsadas con péptido se cocultivaron durante 24 horas y se midió el IFN- γ y en el sobrenadante del cultivo, la producción de IFN- γ en células T2 pulsadas con MAGE-A4 aumentó específicamente. Se realizó un ensayo similar usando células de control (células sin transfección génica). Adicionalmente, se observó producción específica de tumor de IFN- γ en

células diana de LB-23 y NW-MEL-38 positivas para MAGE-A4 y positivas para A2, en comparación con las células inespecíficas de LC-1/sq y MEL72 (Fig. 11).

Puesto que la expresión de CAR por ARNm fue transitoria, se realizó la transfección génica por retrovirus para la expresión permanente de CAR. Después de que se construyese el vector retroviral para la introducción de CAR, se preparó un retrovirus empaquetando células plat-A. El linfocito T-CAR se produjo infectando el retrovirus en PBMC. La transferencia génica se realizó de acuerdo con el método del punto "10. Transferencia génica a células por retrovirus" anterior. La expresión de CAR se confirmó mediante tinción de tetrámero. Por consiguiente, la tasa positiva de CAR de linfocitos T-CAR fue del 59,3 % por CD8 y fue del 49,5 % por CD4 (Figura 12).

Los linfocitos T-CAR con transferencia génica por retrovirus y las células T2 pulsadas con péptido se cocultivaron durante 24 horas, se midió el IFN- γ en el sobrenadante de cultivo, la producción de IFN- γ en células T2 pulsadas con MAGE-A4 aumentó específicamente. Se realizó un ensayo similar usando células de control (células sin transfección génica). Adicionalmente, se observó producción específica de tumor de IFN- γ en células diana de LB-23 y NW-MEL-38 positivas para MAGE-A4 y positivas para A2, en comparación con las células inespecíficas de LC-1/sq y MEL72 (Fig. 13). Se confirmó que CAR se expresaba mediante la introducción de ARNm y la introducción del gen de CAR por vectores retrovirales, la célula reconoció específicamente el tumor y produjo IFN- γ .

4. El linfocito T-CAR con introducción del gen de CAR de MAGE n.º 17 reconoció específicamente la célula cancerosa diana y mostró actividad citotóxica.

Se esperaba que el linfocito T-CAR reconociese A2-MAGE-A4 expresado como antígeno en la célula cancerosa, se activase y presentase actividad citotóxica. Se conocen IFN- γ , TNF- α y CD107a como indicadores de activación de linfocitos T, se expresan de forma creciente de acuerdo con la activación de los linfocitos T. Por lo tanto, se realizó la tinción intracelular de citocinas (tinción intracelular de citocinas: ICS) de célula T2 pulsada con péptido y CAR de MAGE n.º 17 cocultivado con célula diana.

Como resultado, la relación de linfocitos T-CAR teñidos con IFN- γ , TNF- α y CD107a aumentó en cocultivo con célula T2 pulsada con MAGE-A4p230 (Figura 14). Además, la relación de linfocitos T-CAR teñidos con IFN- γ , TNF- α y CD107a aumentó en cocultivo con células diana cuando se cocultivaron con LB-23 y NW-MEL-38 positivas para MAGE-A4 y positivas para A2 (Figura 15).

5. La producción de IFN- γ en linfocitos T-CAR aumentó mediante la presentación de antígeno de célula presentadora de antígeno (APC) que tomó el antígeno de péptido largo de MAGE-A4.

Se separaron PBMC de sangre periférica humana sana, la selección negativa se realizó mediante perlas magnéticas de CD3, las fracciones de CD3 se usaron como células presentadoras de antígeno (APC). A2-APC como APC en el que se presentó MAGE-A4p230 y A24-APC como APC para control negativo. Se añadieron péptido largo de MAGE-A4 y péptido largo de CHP-MAGE-A4 a una concentración final de 10 μ M, se cultivaron durante la noche y se cocultivaron con linfocitos T-CAR durante 24 horas. La transfección génica a linfocitos T-CAR se realizó de acuerdo con el método del punto "10. Transferencia génica a células por retrovirus" anterior. Como resultado, la concentración de IFN- γ en el sobrenadante de cultivo aumentó en cocultivo con A2-APC pulsada con péptido largo de MAGE-A4 (Figura 16).

Los péptidos largos de MAGE-A4 se incorporaron en APC, MAGE-A4p230 se presentó con MHC de clase I, la producción de IFN- γ de linfocitos T-CAR que reconocieron el complejo MAGE-A4p230-MHC-clase I aumentó específicamente. Por otro lado, no se observó producción específica de IFN- γ en péptidos largos de CHP-MAGEA4 envueltos en CHP Nanogel como sistema de suministro de fármacos.

6. Los linfocitos T-CAR en donde se transfirió el gen de CAR de MAGE n.º 17 lisaron específicamente células cancerosas diana.

Se confirmó si la actividad citotóxica específica de CAR de MAGE n.º 17 se observó o no mediante ensayo de liberación de ^{51}Cr . Cuando la relación de linfocitos T-CAR y células cancerosas diana era la relación E/T (relación efector/diana), las células cancerosas que tomaron Cr y los linfocitos T-CAR se cocultivaron durante 8 horas con una relación ET de 10:1, 3:1, 1:1, la tasa de citotoxicidad (% de lisis) se determinó a partir de la radiactividad de ^{51}Cr en el sobrenadante. La transferencia génica a linfocitos T-CAR se realizó de acuerdo con el método del punto "10. Transferencia génica a células por retrovirus" anterior.

Como resultado, se observó citotoxicidad específica de MAGE-A4 en células T2 pulsadas con péptido p230 de MAGE-A4 (Figura 17). Adicionalmente, en las células diana, se confirmó la citotoxicidad específica contra células NW-MEL-38 que eran células positivas para MAGE-A4 y positivas para A2 (Figura 18).

7. Modelo de terapia contra el cáncer en ratón

(1) Modelo que usa NW-MEL-38 y HCT116

Puesto que el ratón NOG carece del receptor de γ y común, los linfocitos NK no existen en el ratón. Por lo tanto, el injerto de células humanas y tejido humano es significativamente mayor en ratones NOG que en ratones NOD-SCID, el cáncer humano y el tejido humano se pueden injertar fácilmente en NOG. Adicionalmente, puesto que se observa diferenciación de linfocitos T humanos después del trasplante de células madre hematopoyéticas humanas, se esperaba que el modelo de ratón NOG fuera un modelo de sistema inmunitario humano. Los ratones NOG tienen las características que contienen la supresión de linfocitos T y linfocitos B, la supresión de linfocitos NK, la reducción de las funciones de las células dendríticas, la disminución de las funciones de los macrófagos, la pérdida de actividad del complemento, la falta de fuga de linfocitos B y linfocitos T asociada al envejecimiento (fugas).

A los ratones NOG se les inyectaron NW-MEL-38 (positivas para MAGE-A4 y positivas para A2) a $2,5 \times 10^6$ células/ratón en el lado derecho del ratón y se les inyectaron HCT116 (negativas para MAGE-A4 y positivas para A2) a $2,5 \times 10^6$ células/ratón por vía subcutánea en el lado izquierdo del ratón. Como pretratamiento, se realizó irradiación corporal total (TBI) con 2,5 Gy a ratones NOG los 6 días posteriores al trasplante del tumor. A medida que el TBI reducía los linfocitos en los receptores, los linfocitos de donante trasplantados se injertarían fácilmente. El día 7, se infundieron linfocitos T-CAR de MAGE n.º 17 y linfocitos humanos desde la vena de la cola a 1×10^7 células/animal. La transferencia génica a linfocitos T-CAR se realizó de acuerdo con el método del punto "10. Transferencia génica a células por retrovirus" anterior. La tasa de CAR positiva fue del 36,3 % por CD8 y fue del 38,5 % por CD4 (Figura 19).

Se realizaron los experimentos que contenían el grupo de infusión de linfocitos T-CAR ($n = 2$), el grupo de infusión de linfocitos humanos (sin transfección de CAR ($n = 2$)) y el grupo de PBS ($n = 2$), los tamaños de los tumores y los pesos corporales se midieron cada 2-3 días. Las mediciones se realizaron hasta 42 días después de la implantación tumoral.

Como resultado, en el grupo infundido con linfocitos T-CAR, se observó inhibición del crecimiento de NW-MEL-38 (positivas para MAGE-A4 y positivos para A2) en el ratón n.º 1 y el ratón n.º 2. Por otro lado, no se observó inhibición del crecimiento de HCT116 (negativas para MAGE-A4 y positivos para A2). El ratón n.º 1 murió después de 34 días desde la implantación tumoral. La causa de la muerte no fue una muerte por tumor, sino que sería una infección (Figura 20).

(2) Experimentos de los efectos de las diferencias del dominio intracelular (ICD)

A continuación, se confirmaron los efectos de los linfocitos T-CAR debido a las diferencias en la porción de ICD. La Figura 21 mostró la imagen de secuencia génica de CAR zG. En CAR zG, se usó el ICD de GITR en lugar del de CD28. GITR es el receptor del factor de necrosis tumoral inducible por glucocorticoides, se sabe que usando ICR en CAR el nivel de expresión de citocinas fue superior que con el de CAR (documento WO2013051718). En CAR zG, el ICD de CD28 en CAR 28z en la figura 2 se cambió por ICD de GITR, y se cambió el orden de CD3 ζ y los dominios ICD en CAR 28z. Se usaron otras partes con secuencias idénticas de CAR 28z.

Se inyectaron NW-MEL-38 (positivas para MAGE-A4 y positivas para A2) a $2,5 \times 10^6$ células/ratón por vía subcutánea a ratones NOG. Tres días después de la implantación tumoral, se realizó irradiación corporal total (TBI) con 2,0 Gy como pretratamiento. El día 4, se infundieron a través de la vena de la cola células o PBS y linfocitos humanos 4×10^6 células/ratón a cada grupo A - C ($n=4$) que se muestra a continuación. La transferencia génica a linfocitos T-CAR se realizó de acuerdo con el método del punto "10. Transferencia génica a células por retrovirus" anterior. Se infundieron PBS en el grupo A, linfocitos T-CAR de MAGE n.º 17 en el grupo B (28z) y linfocitos T-CAR (zG) en el grupo C.

El diámetro de los tumores y el peso corporal se midieron cada 2-3 días para el grupo A a C. Las mediciones se realizaron hasta 24 días después de la implantación tumoral.

Como resultado, se observó inhibición del crecimiento de NW-MEL-38 (positivas para MAGE-A4 y positivas para A2), cuando se infundieron linfocitos T-CAR con 28z de ICT o zG de ICT (Figura 22). En la realización, se descubrió que se obtuvo el mismo efecto al cambiar el dominio intracelular.

8. Experimentos de los efectos de linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo zG y linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo 4-1BBz

(1) Construyendo el vector retroviral con introducción de CAR de tipo zG y CAR de tipo 28z, después preparando retrovirus con células de empaquetamiento plat-A, se produjeron linfocitos T-CAR infectando el retrovirus en PBMC. La transferencia génica se realizó de acuerdo con el método del punto "10. Transferencia génica a células por retrovirus" anterior. La expresión de CAR se confirmó mediante tinción de tetrámero. Por consiguiente, la tasa positiva de CAR de linfocitos T-CAR de tipo zG fue del 99,1 % por CD8 y la de linfocitos T-CAR de tipo 28z fue del 99,8 % por CD8 (Figura 23).

(2) Se cocultivaron durante 18 horas linfocitos T-CAR con transfección génica por retrovirus (4×10^4 células) y células T2 pulsadas con péptido, NW-MEL-38, SK-MEL-37 y HCT116 (respectivamente 2×10^5 células), se midió INF- γ en el sobrenadante de cultivo. Como se muestra en la figura 24, la producción de INF- γ aumentó específicamente en linfocitos T-CAR transfectados con CAR de tipo zG y CAR de tipo 28z, en células T2 pulsadas con MAGE-A4 y células NW-MEL-38 y células SK-MEL-37.

Se realizó un ensayo similar usando células de control (células sin transfección génica). no se observó producción de IFN- γ en HCT116 de MAGE-A4 positiva para A2 como célula diana. No se observó producción de IFN- γ en efectores solamente (Sólo efector) y en la diana solamente (Sólo diana).

5 Por lo tanto, los linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo zG indujo la producción de INF- γ *in vitro*. Los datos pueden explicar satisfactoriamente los resultados obtenidos *in vivo*.

10 (3) A continuación, se realizaron ensayos similares a (1) y (2) usando linfocitos T positivos para CD8 con introducción de CAR de tipo 4-1BBz para obtener los caracteres de las células. Como se muestra en la figura 25, en linfocitos T-CAR transfectados con CAR de tipo 4-1BBz, la producción de IFN- γ aumentó específicamente en células T2 pulsadas con el MAGE-A4.

15 En células T2 pulsadas con péptido de control, no se observó producción de IFN- γ . No se observó producción de IFN- γ en los efectores solamente (Sólo efector) y en la diana solamente (Sólo diana).

Por lo tanto, incluso cuando el ICD se cambió al tipo 4-1BBz, se observó el mismo efecto. Los datos *in vitro* pueden explicar fácilmente los resultados obtenidos *in vivo*.

20 De esta manera, incluso cuando se cambió el ICD, se observó el mismo efecto que para el tipo zG.

25 Por lo tanto, de acuerdo con estas realizaciones, se proporcionó una proteína de unión a antígeno que reconoce específicamente el complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2, ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a antígeno, un vector que contiene los ácidos nucleicos, un receptor de antígeno quimérico que incluye la proteína de unión a antígeno, ácidos nucleicos que codifican el receptor de antígeno quimérico, un vector que contiene los ácidos nucleicos, una célula que expresa el receptor de antígeno quimérico y una composición farmacéutica que contiene las células.

30 La proteína de unión a antígeno que reconoce específicamente el complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2, puede usarse en terapia celular y en el campo de la terapia génica. La invención es extremadamente útil para la detección de células tumorales que expresan el complejo péptido derivado de MAGE-A4/HLA-A2, para curar tumores, y para investigación y experimentos de tumores. Las linfocitos T-CAR de la invención pueden proporcionar una terapia contra el cáncer muy eficaz, puesto que los efectos secundarios son muy pequeños.

35 **Técnica anterior**

[Documento no de patente]

40 Documento no de patente 1: Brentjens RJ, *et al.*: *Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B- leukemias*. *Blood* 2011, 118:4817-4828.

Documento no de patente 2: Dao T, Yan S, Veomett N, Pankov D, Zhou L, Korontsvit T, *et al.*: *Targeting the intracellular WT1 oncogene product with a therapeutic human antibody*. *Sci Transl Med* 2013; 5: 176ra133.

45 Documento no de patente 3: Van Der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T. *Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells*. *Immunological Reviews* 2002. Vol. 188: 51-64.

Documento no de patente 4: Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P. *A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T Lymphocytes*. *Eur. J. Immunol* 1999. 29: 3329-3337.

50 Documento no de patente 5: Muraoka D, Harada N, Hayashi T, Tahara Y, Momose F, Sawada S, Mukai SA, Akiyoshi K, Shiku H. *Nanogel-based immunologically stealth vaccine targets macrophages in the medulla of lymph node and induces potent antitumor immunity*. *ACS Nano*. 23 de septiembre de 2014; 8(9):9209-18.

Documento no de patente 6: Hillig RC, Coulie PG, Stroobant V, Saenger W, Ziegler A, Huelsmeyer M. *High-resolution Structure of HLA-A*0201 in Complex with a Tumour-specific Antigenic Peptide Encoded by the MAGE-A4 Gene*. *J. Mol. Biol.* 2001, 310, 1167-1176.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a antígeno que comprende el siguiente polipéptido (A) y que reconoce el complejo HLA-A2-MAGE-A4:
5 (A) el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de VH (región variable de cadena pesada) de SEQ ID NO: 36 y la secuencia de aminoácidos de VL (región variable de cadena ligera) de SEQ ID NO: 38.
2. La proteína de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el siguiente polipéptido (C)
10 entre VH y VL:
(C) el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de sc (cadena sencilla) de SEQ ID NO: 37.
3. La proteína de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende el polipéptido que comprende
15 la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.
4. La proteína de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína de unión a antígeno es Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario (scFv).
- 20 5. Un ácido nucleico que codifica la proteína de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
- 25 7. Un receptor de antígeno quimérico que comprende las proteínas de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un dominio intracelular de una proteína de transducción de señales.
8. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 7, en donde la proteína de transducción de señales es una
30 cualquiera de CD3zeta (CD3ζ) y moléculas coestimuladoras CD (GITR).
9. El receptor de antígeno quimérico de la reivindicación 8, que comprende además uno cualquiera de entre el dominio intracelular de CD28 y GITR.
10. Un ácido nucleico que codifica el receptor de antígeno quimérico de acuerdo con una cualquiera de las
35 reivindicaciones 7 a 9.
11. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Una célula que expresa el receptor de antígeno quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones
40 7 a 9.
13. Una composición farmacéutica que comprende la célula de la reivindicación 12 como principio activo.

Figura 1

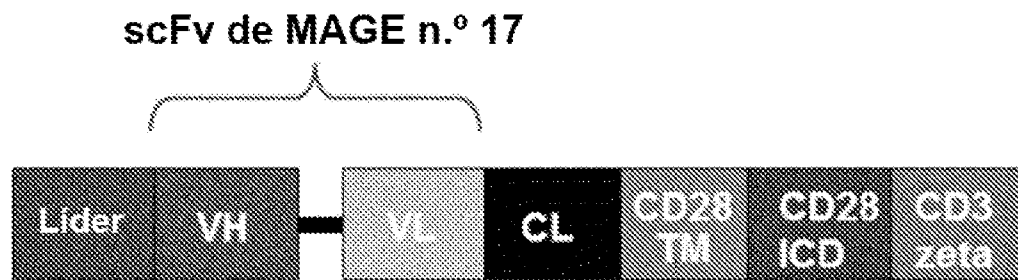


Figura 2

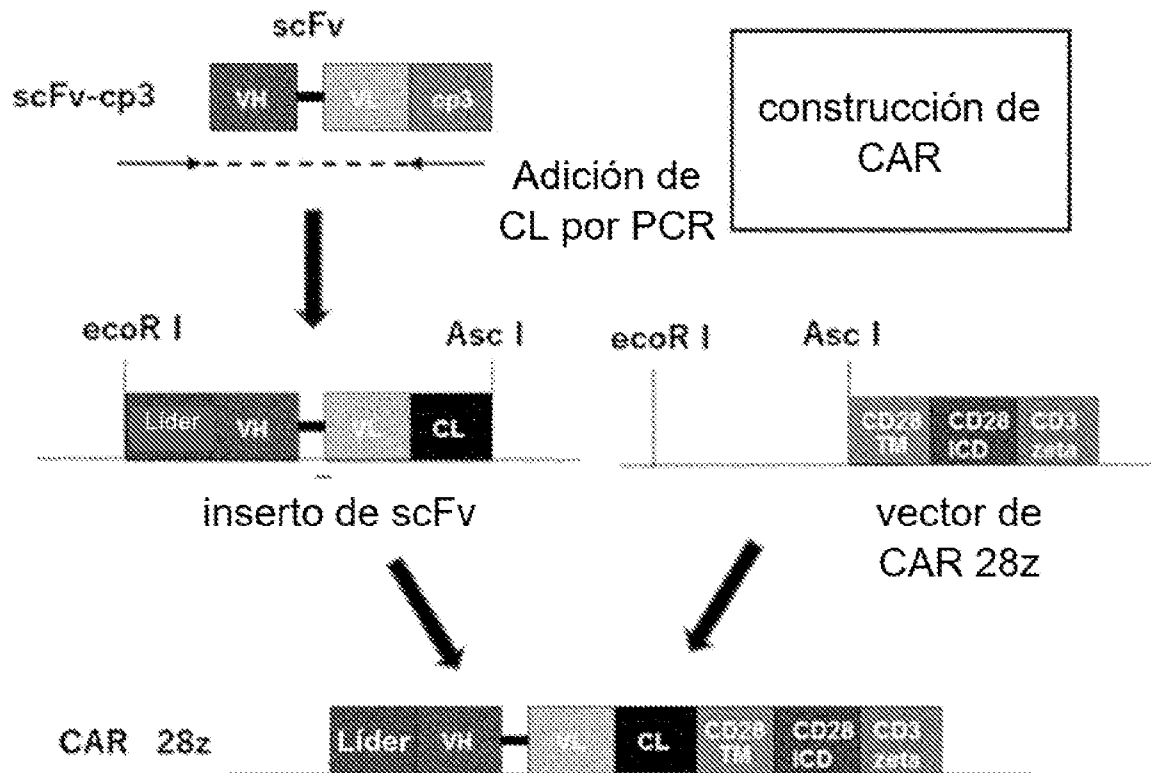
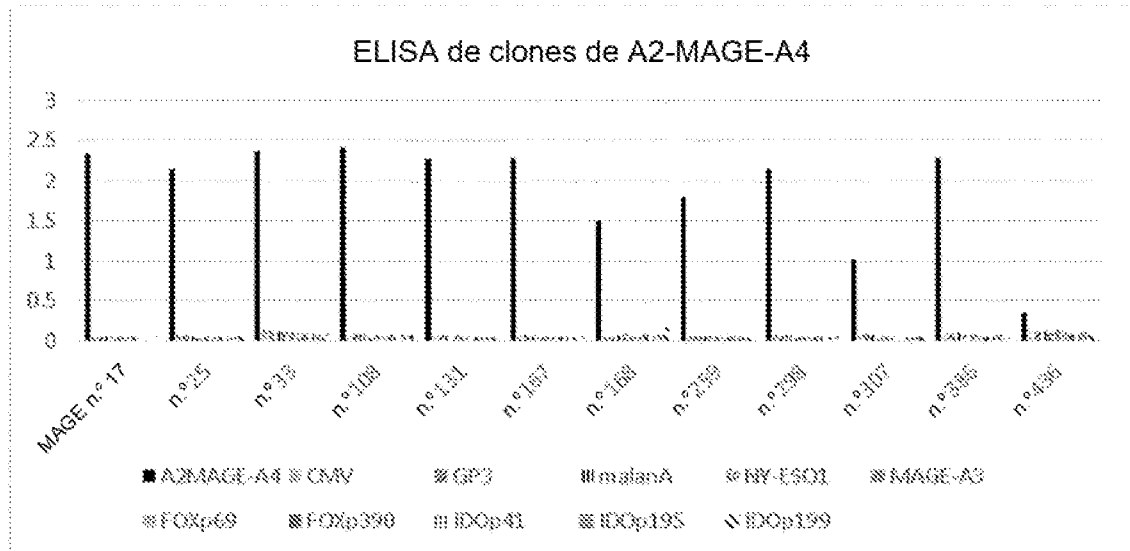


Figura 3

(A)



(B)

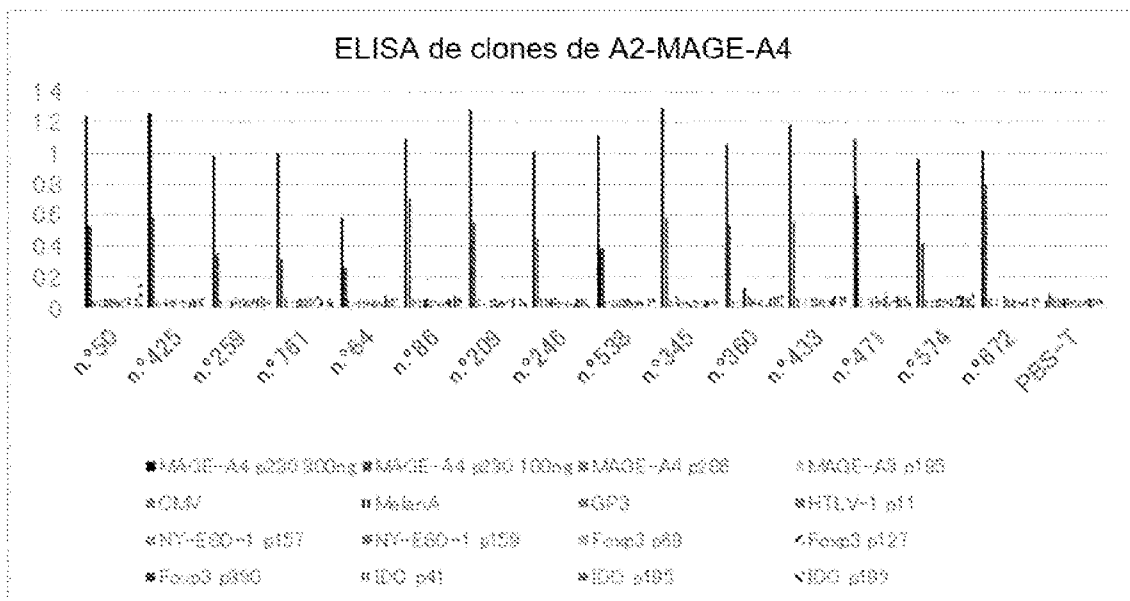


Figura 4

(A)

Evaluación sin guardar

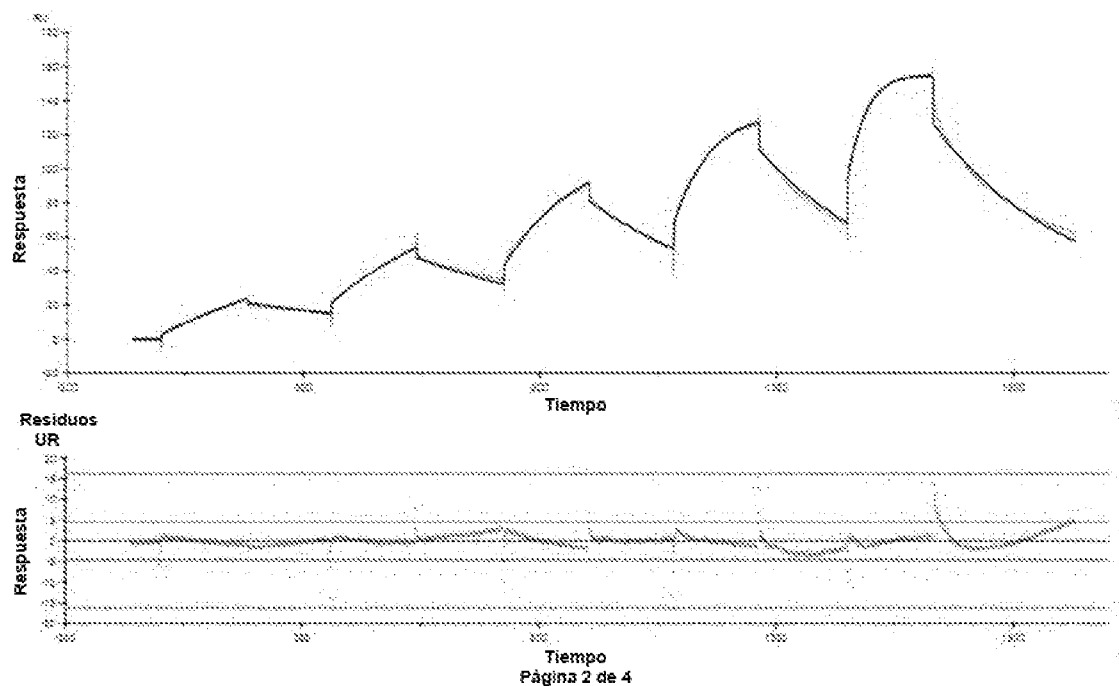
Id de instr.: 1913251

Software de evaluación Biacore X100, versión 2.0.1

Fecha de impresión: 16/6/2016 10:25:03

Cinética: "MAGE n.º 17 mono", ajuste: "1. Unión 1:1"

Muestra: MAGE n.º 17 mono Temp.: 25 °C Curva: Fc = 2-1



(B)

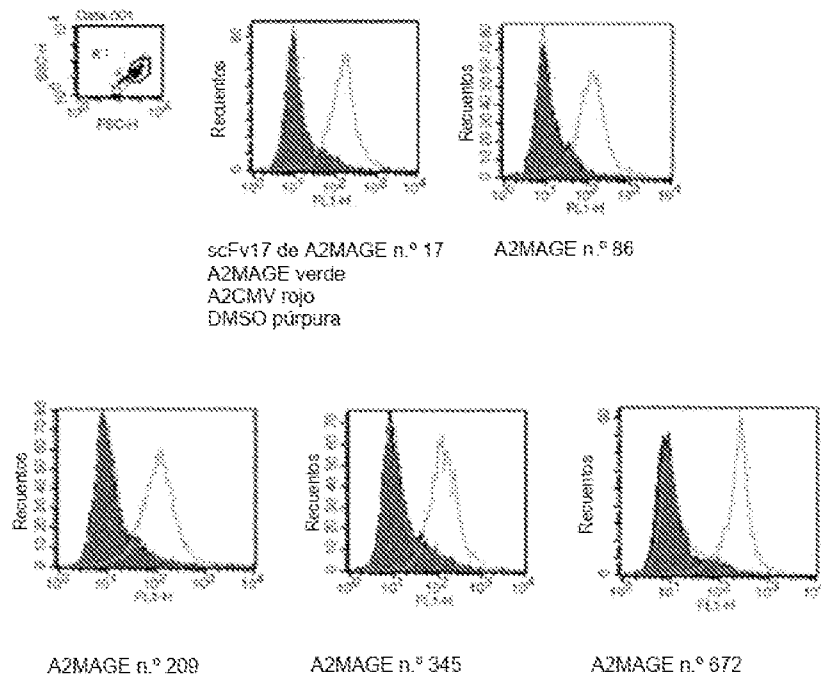
Cinética: "MAGE n.º 17 mono", ajuste: "1. Unión 1:1" (continuación)

Tabla de informe

Curva	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	R_{max} (RU)	K_{Dapp} (M)	f_c	Flujo (ul/min)	k_t (UR/Ms)	IR (UR)	χ^2 (UR ²)	valor U
	$1.597E+5$	0.010571	$2.237E-6$	141.7		$7.861E+6$				3.27	1
Ciclo: 6					$1.290E-6$		30.10	$2.440E+7$	2.317		
					$2.500E-8$				3.897		
					$0.000E+0$				11.01		
					$1.090E-7$				15.80		
					$0.000E+0$				37.54		

Figura 5

(A)



(B)

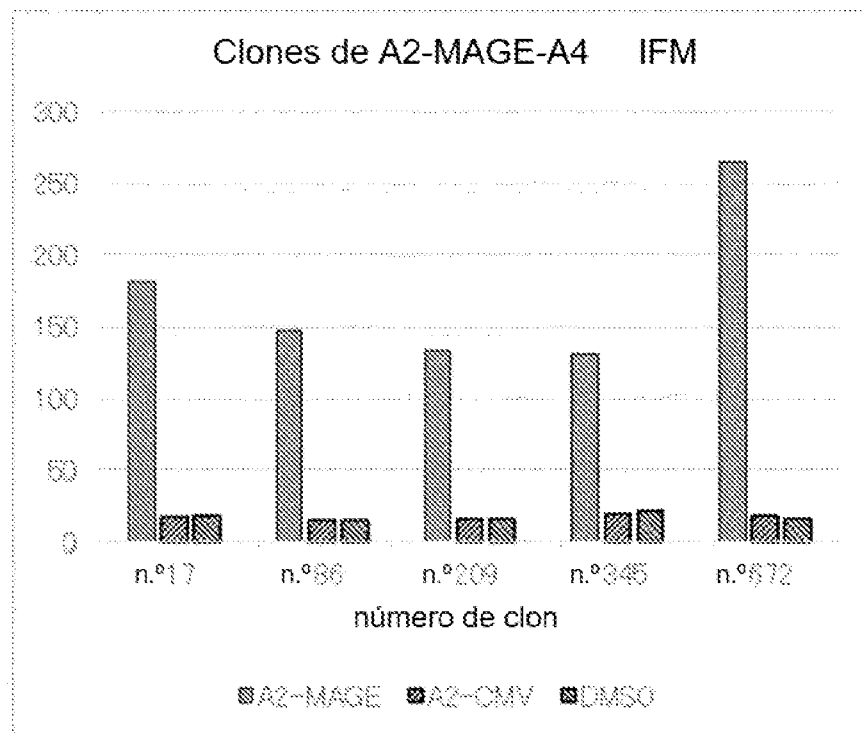


Figura 6

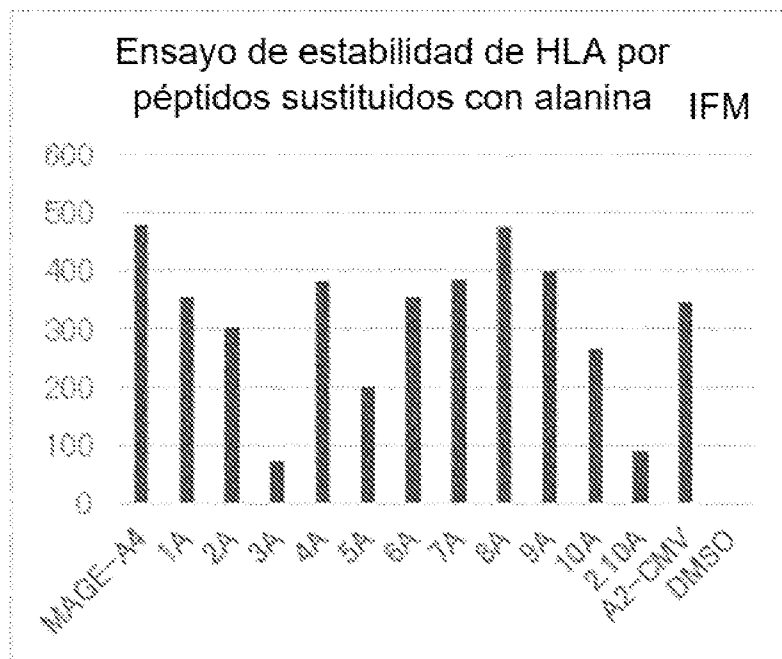


Figura 7

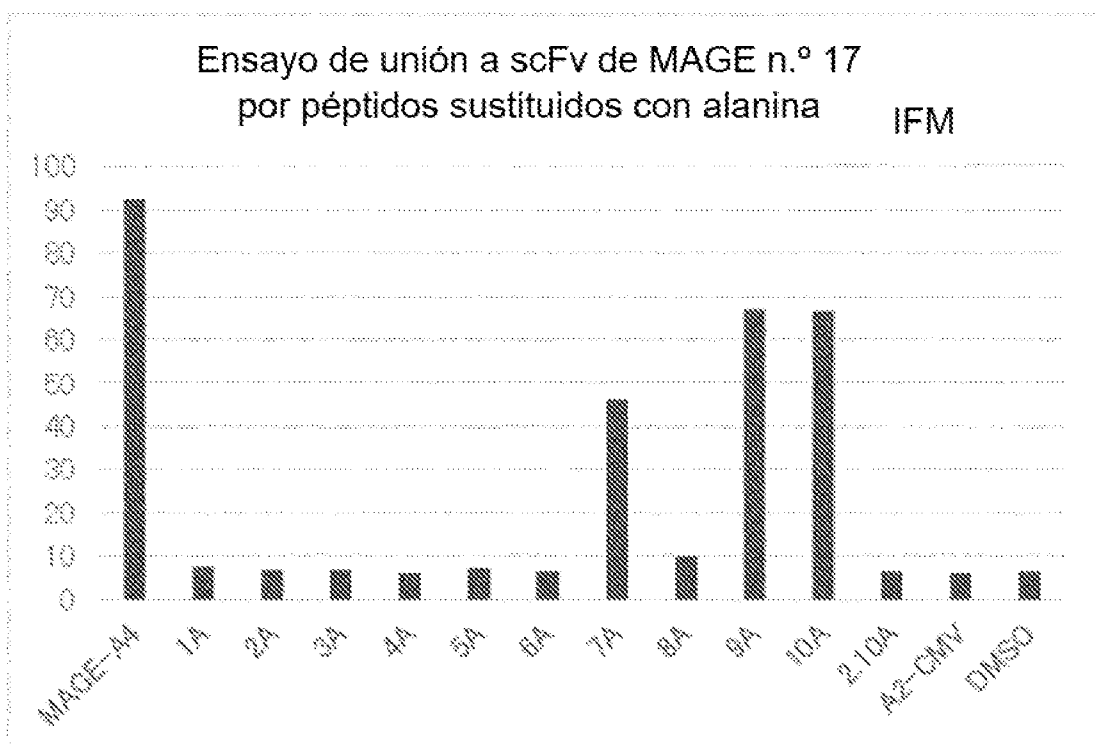


Figura 8

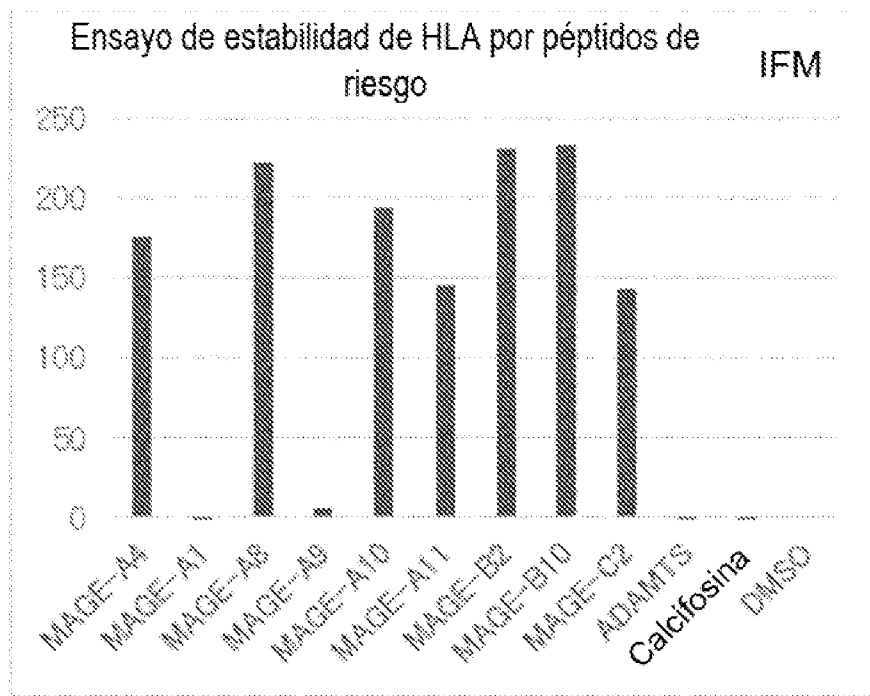


Figura 9

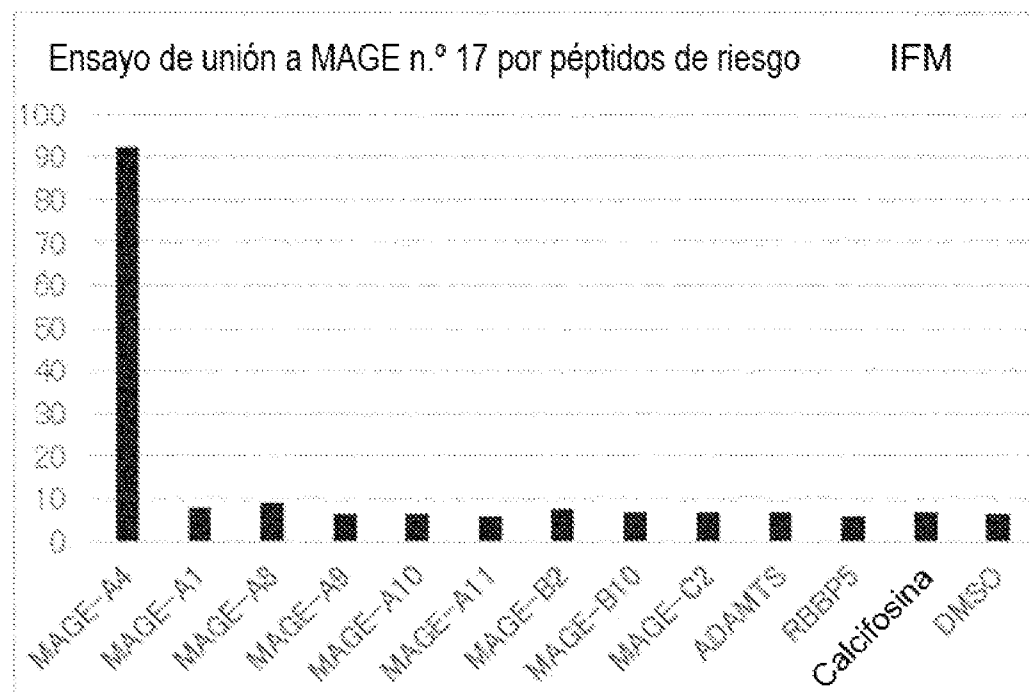


Figura 10

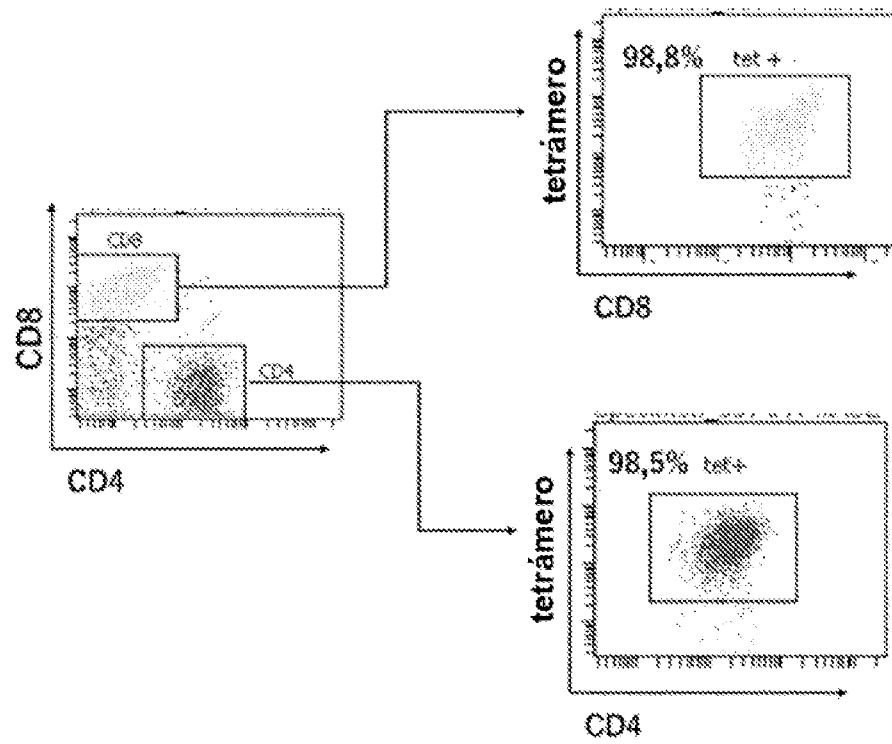
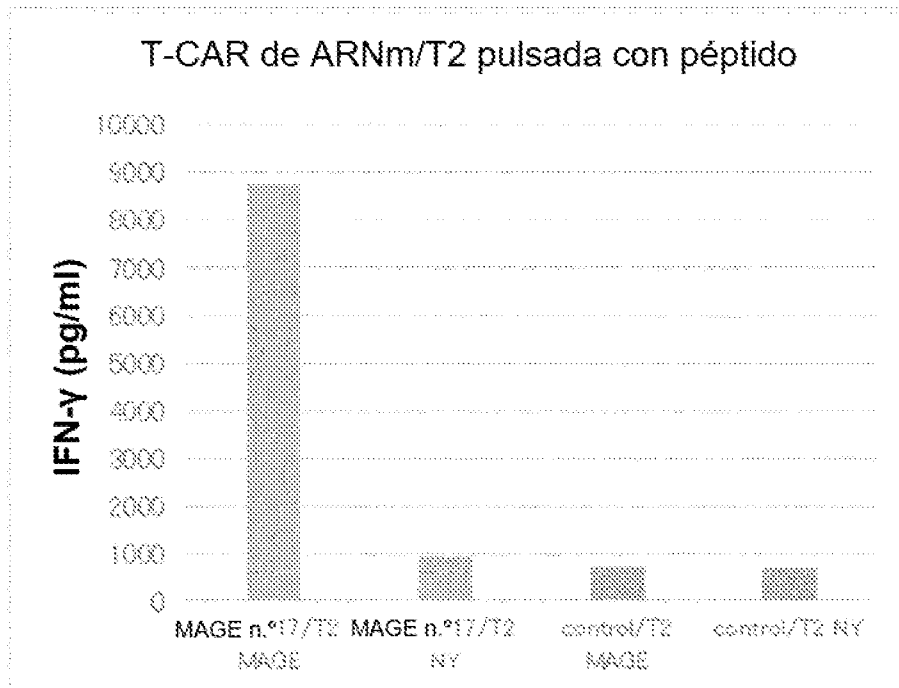


Figura 11

(A)



(B)

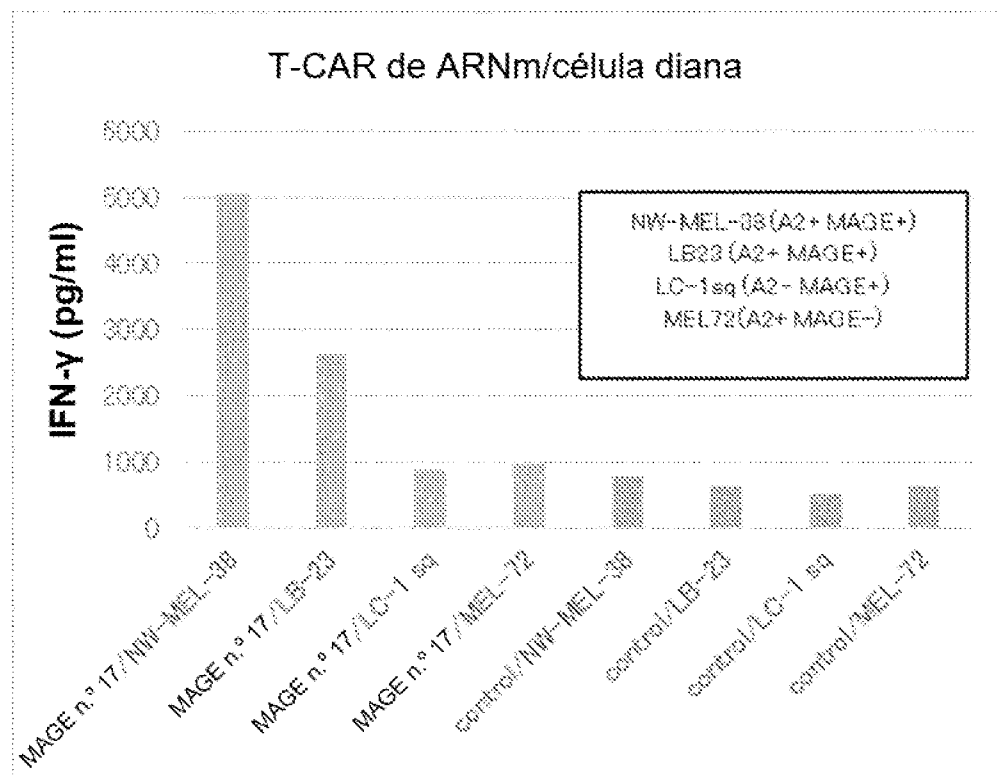


Figura 12

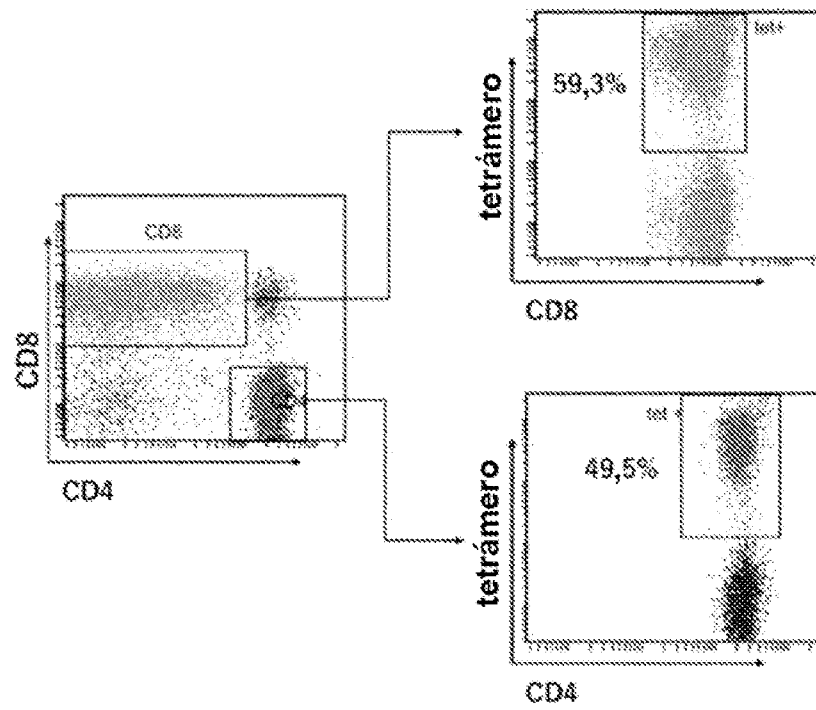
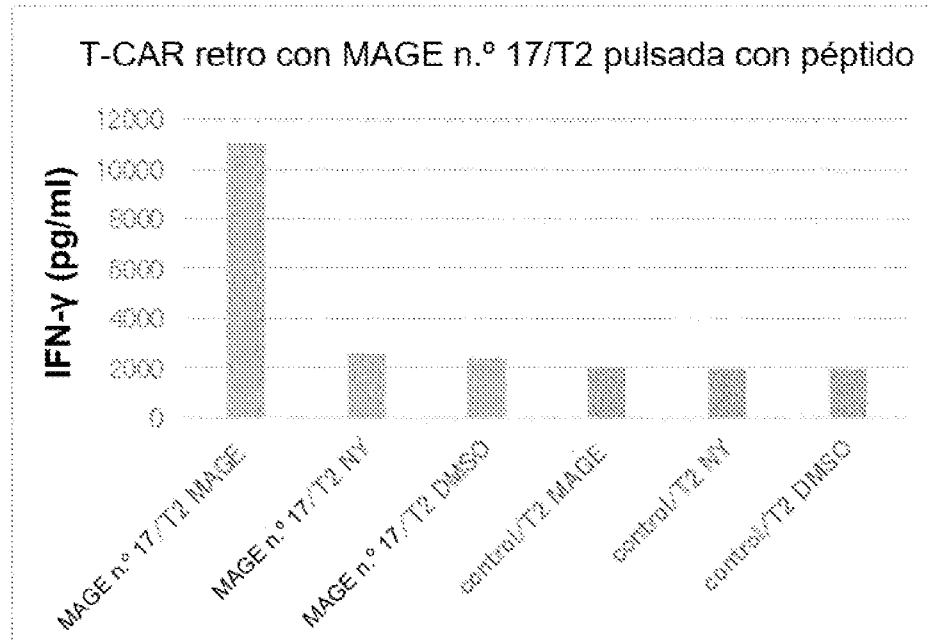


Figura 13

(A)



(B)

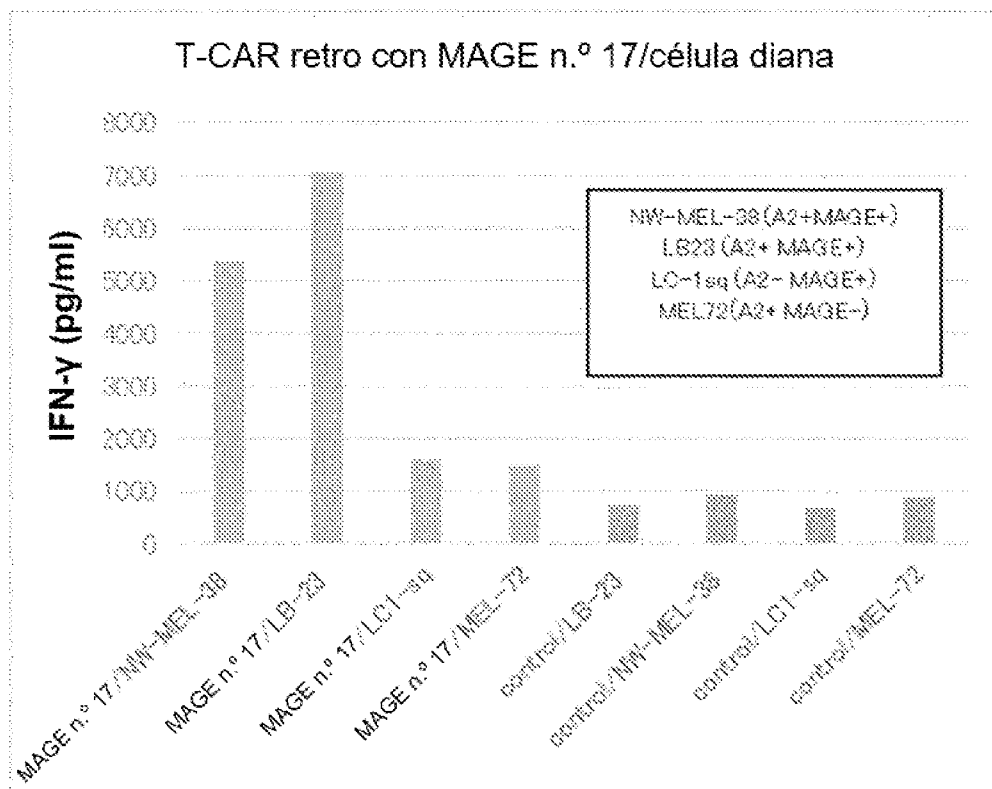


Figura 14

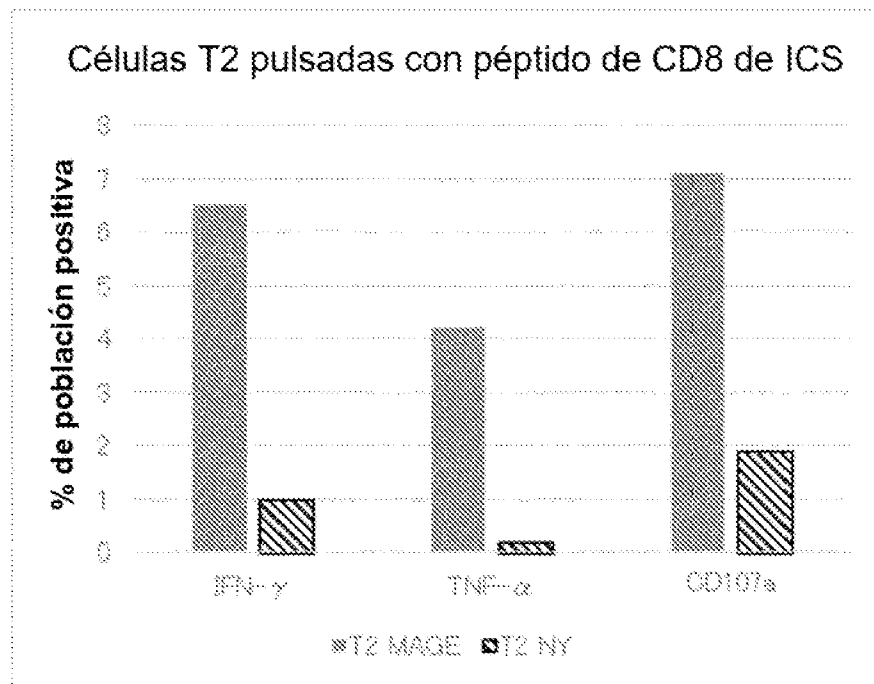


Figura 15

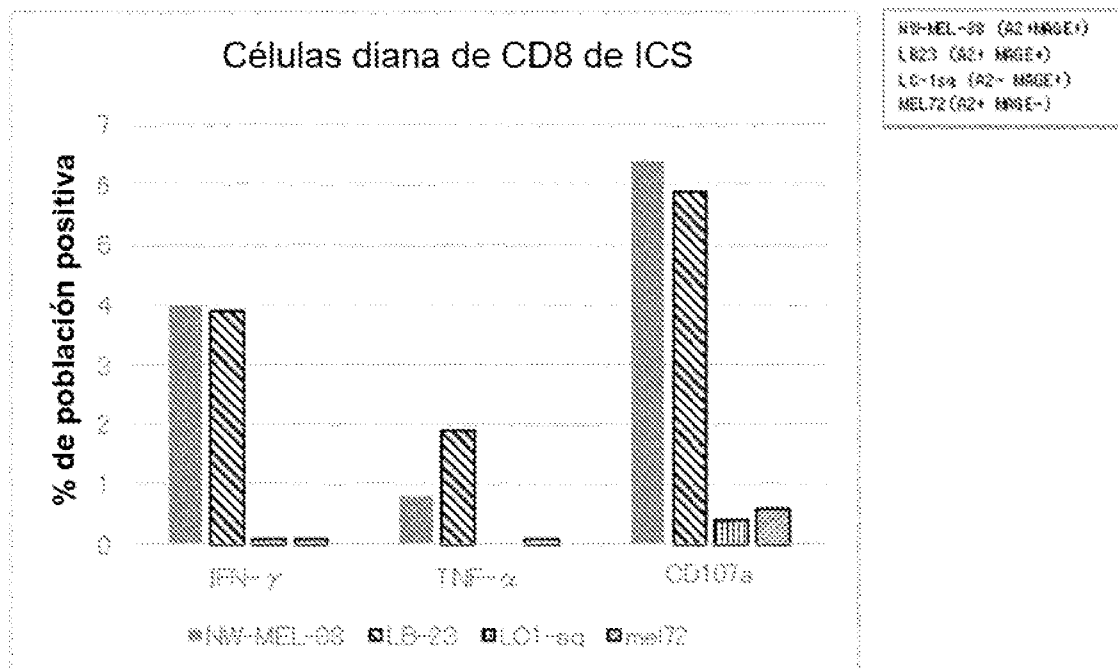


Figura 16

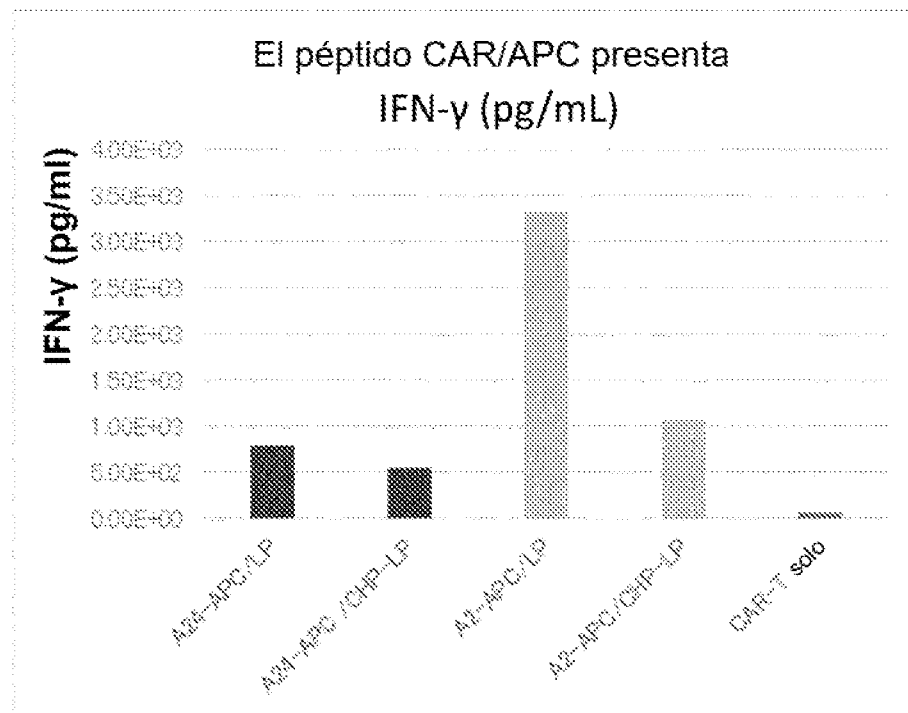


Figura 17

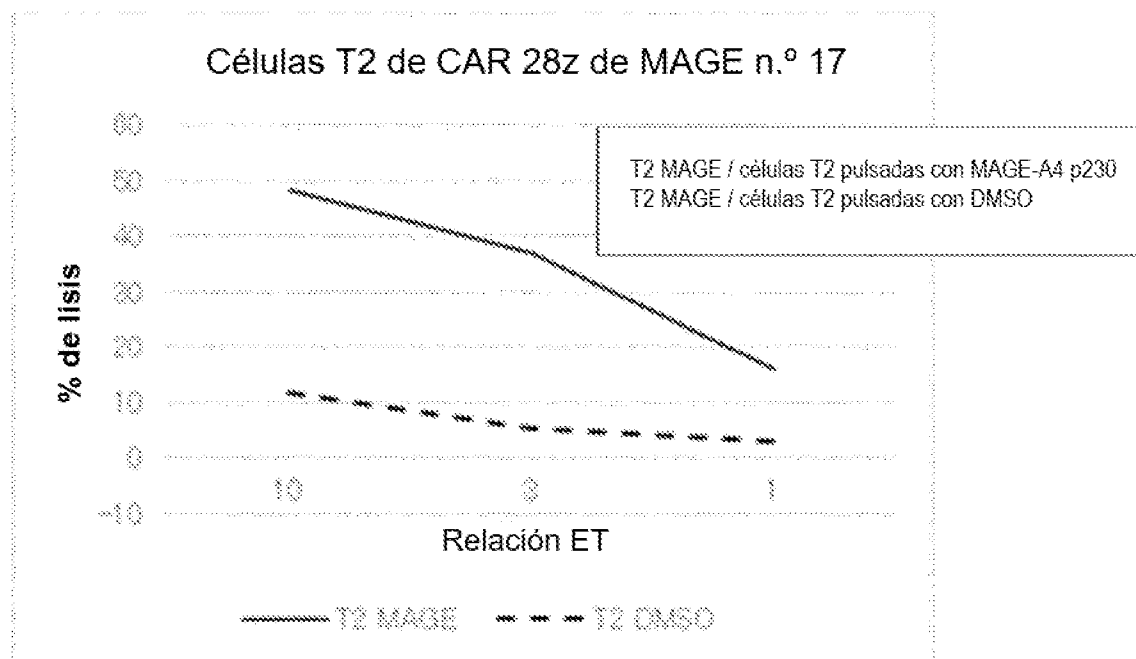


Figura 18

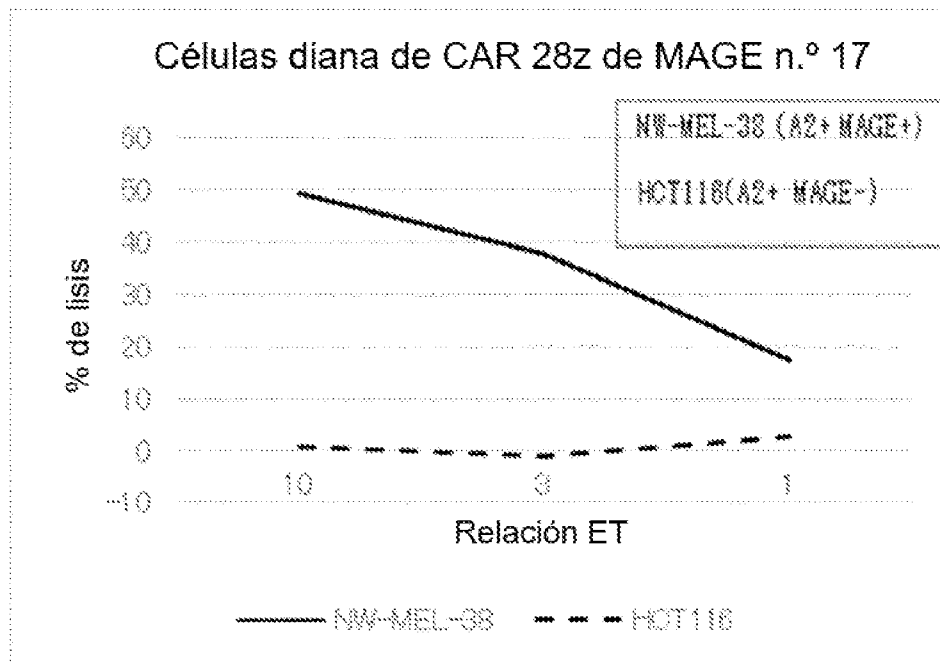


Figura 19

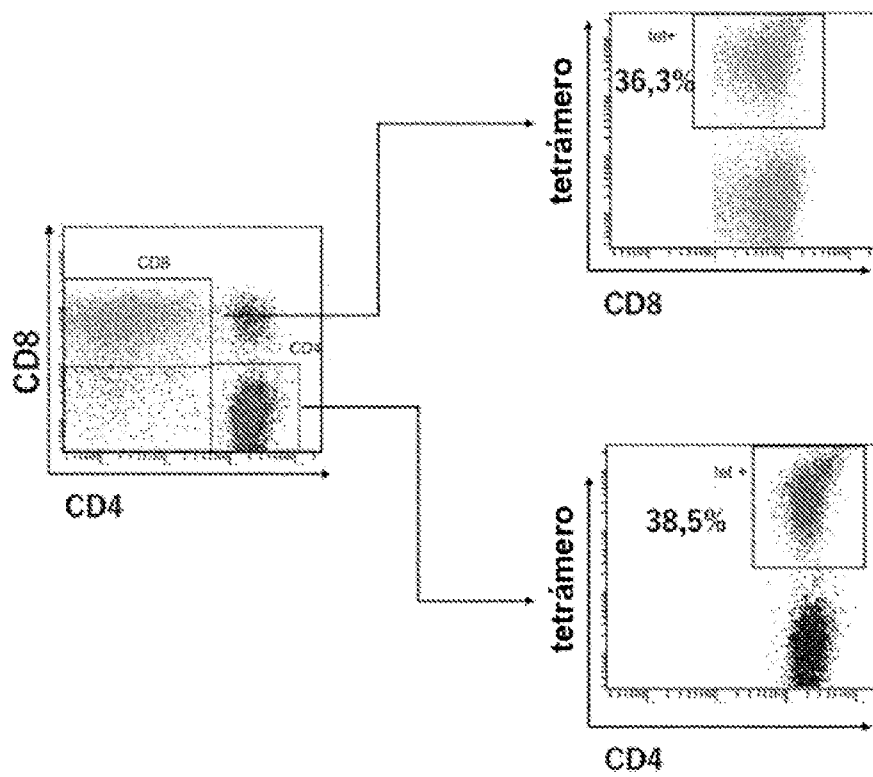


Figura 20

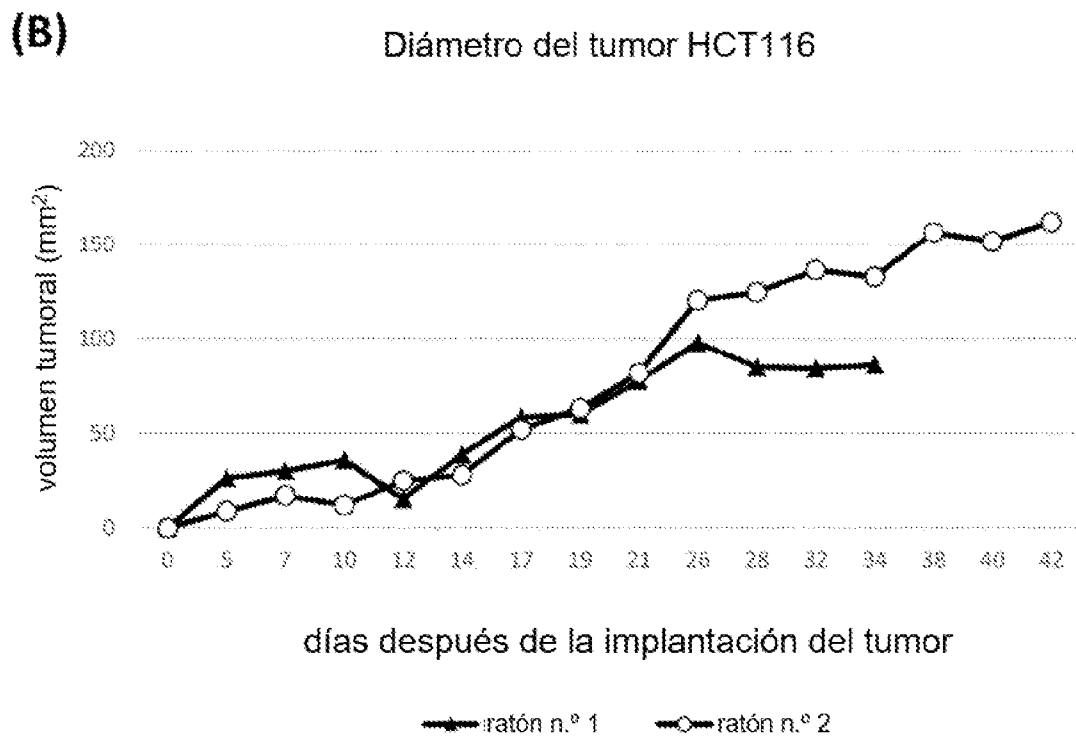
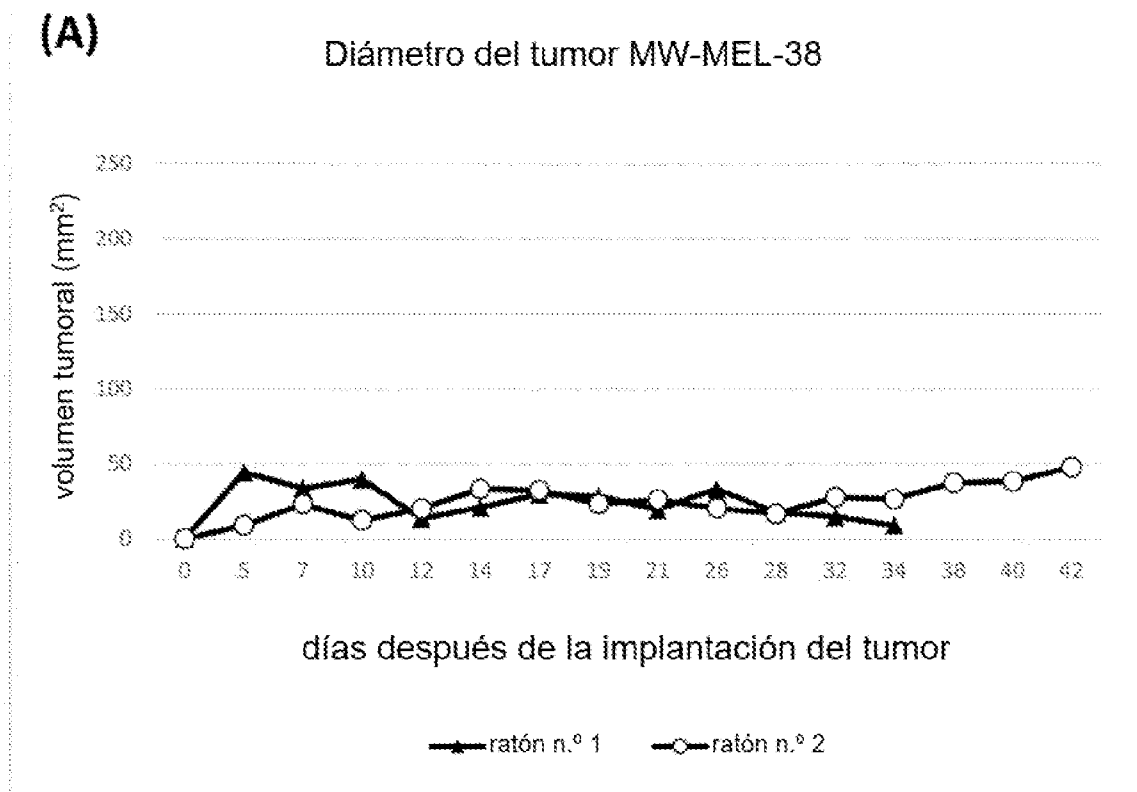
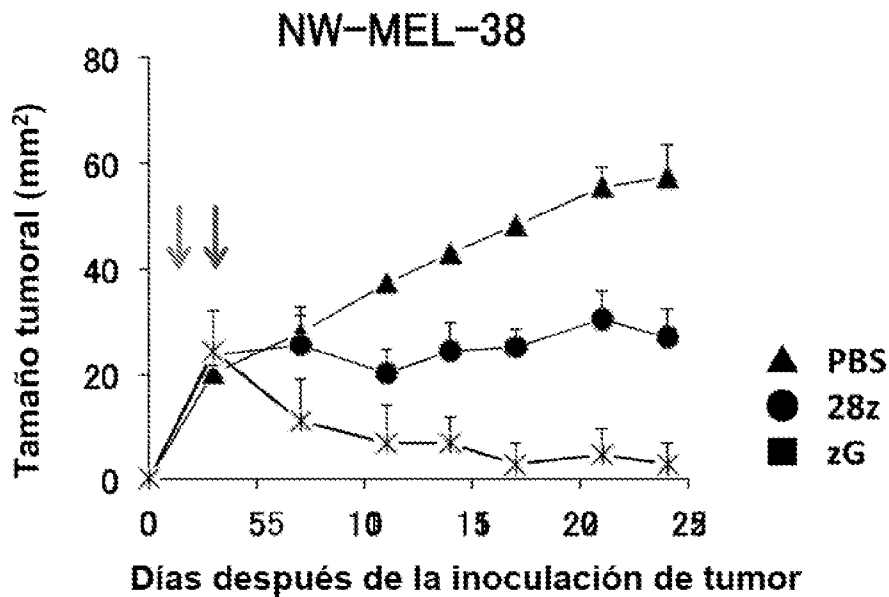


Figura 21



Figura 22

(A) Diámetros de los tumores



(B) Pesos corporales

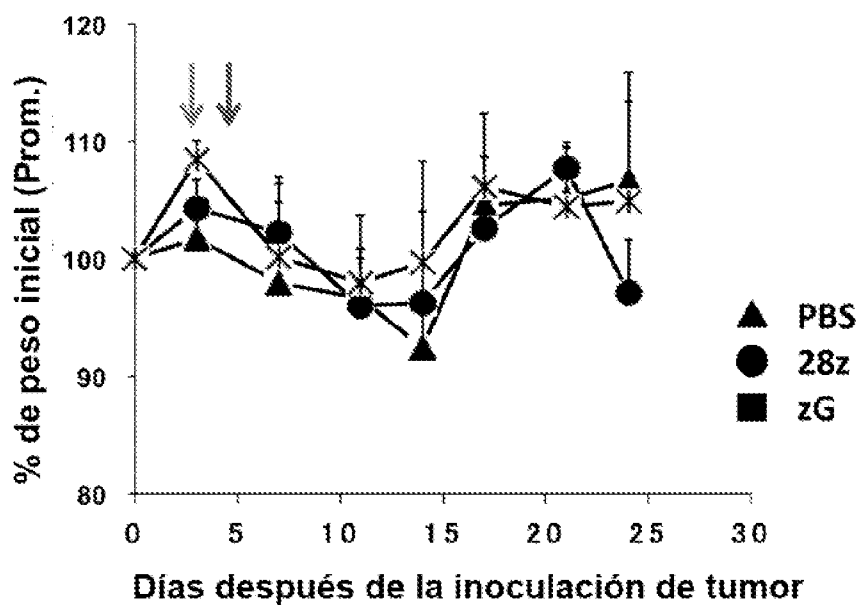


Figura 23

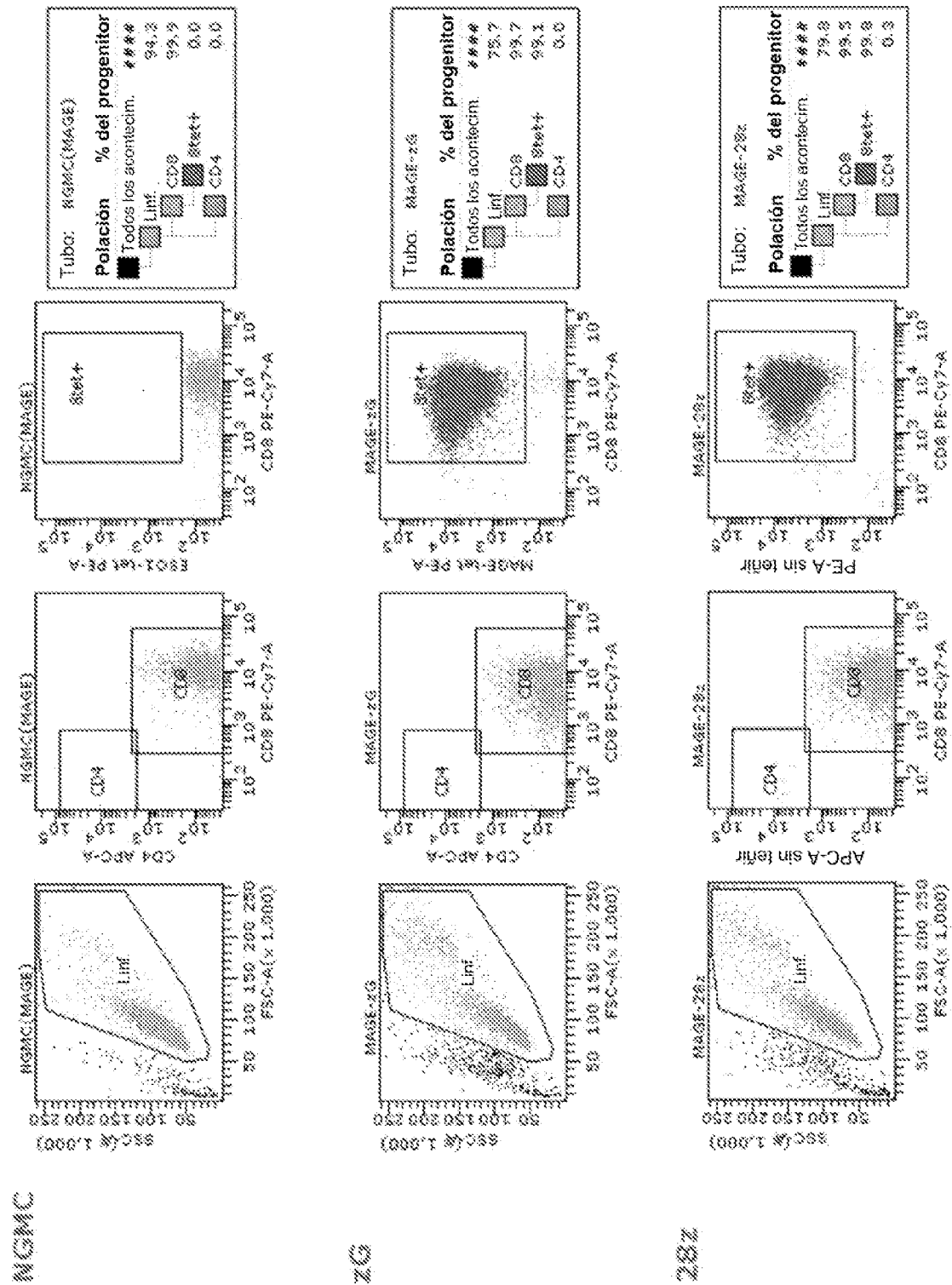


Figura 24

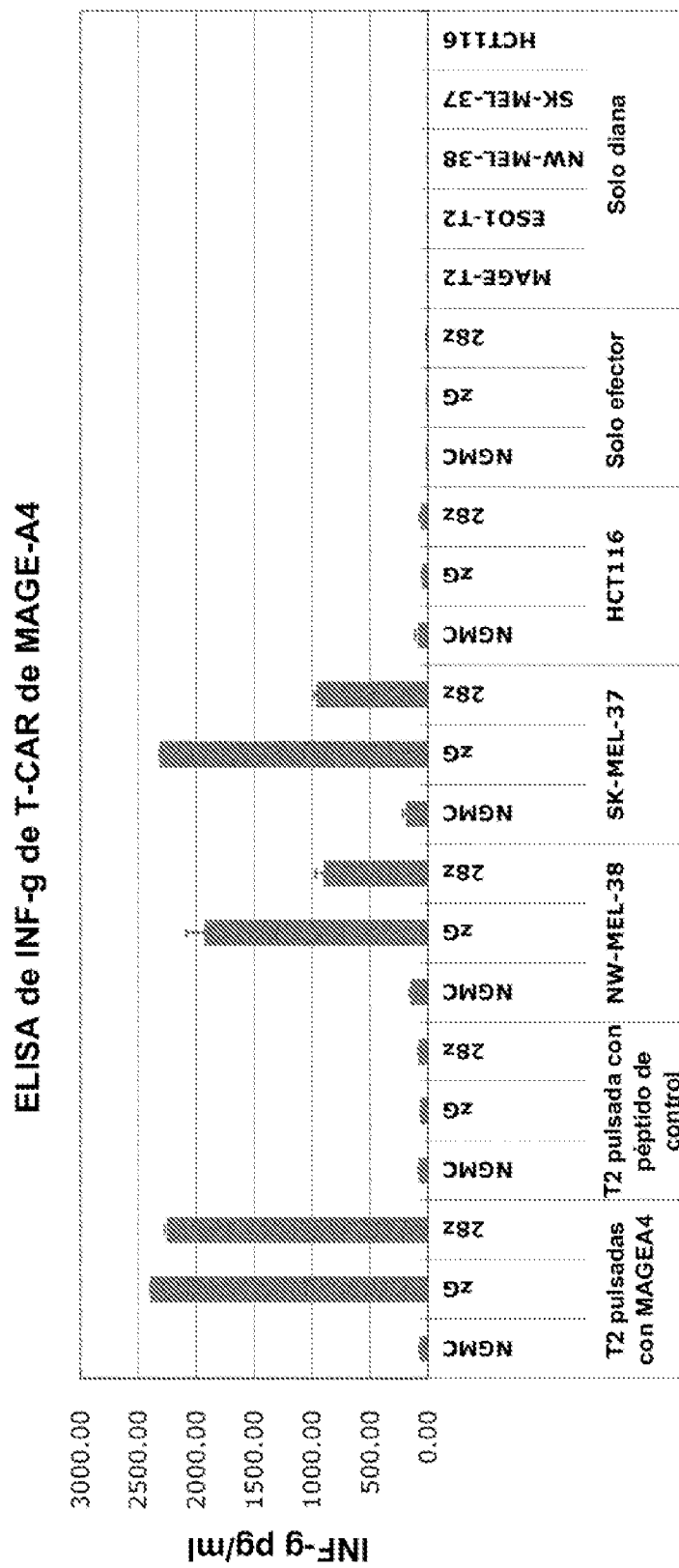


Figura 25

