

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 838**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/725** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 35/26** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2015** **E 20160141 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 3708579**

54 Título: **Inmunorreceptores y epitopos de células T específicos de Claudina-6**

30 Prioridad:

**01.04.2014 WO PCT/EP2014/000868**

**24.10.2014 WO PCT/EP2014/072864**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.10.2024**

73 Titular/es:

**BIONTECH CELL & GENE THERAPIES GMBH**  
**(33.3%)**

**An der Goldgrube 12**

**55131 Mainz, DE;**

**TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN**  
**DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES**  
**GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ**

**GEMEINNÜTZIGE GMBH (33.3%) y**  
**ASTELLAS PHARMA INC. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;**

**TÜRECI, ÖZLEM;**

**OEHM, PETRA;**

**OMOKOKO, TANA;**

**HOFF, HOLGER;**

**VOSS, RALF-HOLGER;**

**BREITKREUZ, ANDREA;**

**HOBOHM, KATHLEEN y**

**MROZ, KAROLINA ANNA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

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

ES 2 982 838 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

Inmunorreceptores y epítomos de células T específicos de Claudina-6

Campo técnico

- 5 La presente enseñanza se refiere a la provisión de inmunorreceptores específicos de Claudina-6 (receptores de células T y receptores artificiales de células T (receptores de antígenos quiméricos; CAR)) y epítomos de células T que son útiles para la inmunoterapia.

Antecedentes

La evolución del sistema inmunitario dio lugar a vertebrados en una red altamente efectiva basada en dos tipos de defensa: la inmunidad innata y la adoptiva.

- 10 En contraste con el antiguo sistema inmunitario innato evolutivo que se basa en receptores invariantes que reconocen patrones moleculares comunes asociados con patógenos, la inmunidad adoptiva se basa en receptores de antígenos altamente específicos en células B (linfocitos B) y células T (linfocitos T) y selección clonal.

- 15 Mientras que las células B aumentan las respuestas inmunitarias humorales por la secreción de anticuerpos, las células T median las respuestas inmunitarias celulares que conducen a la destrucción de células reconocidas.

Las células T desempeñan una función central en la inmunidad mediada por células en humanos y animales. El reconocimiento y la unión de un antígeno particular está mediado por los receptores de células T (TCR) expresados en la superficie de las células T.

- 20 El receptor de células T (TCR) de una célula T es capaz de interactuar con péptidos inmunogénicos (epítomos) unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y presentados en la superficie de las células diana. La unión específica del TCR desencadena una cascada de señales dentro de la célula T que conduce a la proliferación y diferenciación en una célula T efectora madurada. Para poder apuntar a una gran variedad de antígenos, los receptores de células T deben tener una gran diversidad.

- 25 Esta diversidad se obtiene mediante el reordenamiento genético de diferentes segmentos discontinuos de genes que codifican las diferentes regiones estructurales de los TCR. Los TCR están compuestos de una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  o de una cadena  $\gamma$  y una cadena. Las cadenas TCR  $\alpha/\beta$  están compuestas por una región variable altamente polimórfica de terminal N involucrada en el reconocimiento de antígenos y una región constante invariante. En el nivel genético, estas cadenas se separan en varias regiones, una región variable (V), una región de diversidad (D) (solo cadenas  $\beta$  y  $\delta$ ), una región de unión (J) y una región constante (C). Los genes de la cadena  $\beta$  humana contienen más de 60 variables (V), 2 diversidad (D), más de 10 segmentos de unión (J) y 2 segmentos de región constante (C). Los genes de la cadena  $\alpha$  humana contienen más de 50 segmentos V, y más de 60 segmentos J pero ningún segmento D, así como un segmento C. Los genes murinos de la cadena  $\beta$  contienen más de 30 variables (V), 2 de diversidad (D), más de 10 segmentos de unión (J) y 2 segmentos de región constante (C). Los genes murinos  $\alpha$  de cadena  $\alpha$  contienen casi 100 segmentos V, 60 segmentos J, ningún segmento D, pero un segmento C. Durante la diferenciación de las células T, se crean genes receptores de células T específicas mediante la reorganización de un gen de la región V, una D (solo de las cadenas  $\beta$  y  $\delta$ ), un gen de región J y uno de C. La diversidad de los TCR se amplifica adicionalmente por un reordenamiento V-(D)-J impreciso en el que se introducen y/o se eliminan nucleótidos aleatorios en los sitios de recombinación. Dado que la reorganización de los loci del gen TCR se produce en el genoma durante la maduración de las células T, cada célula T madura solo expresa un TCR  $\alpha/\beta$  específico o TCR  $\gamma/\delta$ .
- 30
- 35
- 40

La unión de MHC y antígeno está mediada por las regiones 1, 2 y 3 determinantes complementarias (CDR1, CDR2, CDR3) del TCR. La CDR3 de la cadena  $\beta$  que es más crítica para el reconocimiento y la unión del antígeno está codificada por la unión V-D-J del gen de la cadena  $\beta$  del TCR reordenado.

- 45 El TCR es parte de una maquinaria de señalización compleja, que incluye el complejo heterodimérico de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR, el correceptor CD4 o CD8 y el módulo de transducción de señal CD3 (Figura 1). Mientras que las cadenas CD3 transfieren la señal de activación dentro de la célula, el heterodímero  $\alpha/\beta$  TCR es el único responsable del reconocimiento de antígenos. Por lo tanto, la transferencia de las cadenas TCR  $\alpha/\beta$  ofrece la oportunidad de redirigir las células T hacia cualquier antígeno de interés.

- 50 Inmunoterapia

La inmunoterapia específica para antígenos tiene como objetivo mejorar o inducir respuestas inmunitarias específicas en pacientes para controlar enfermedades infecciosas o malignas. La identificación de un número creciente de antígenos asociados a patógenos y tumores (TAA) llevó a una amplia colección de objetivos

adecuados para la inmunoterapia. Las células que presentan péptidos inmunogénicos (epítomos) derivados de estos antígenos pueden ser dirigidas específicamente por estrategias de inmunización activas o pasivas.

La inmunización activa tiende a inducir y expandir las células T específicas de antígeno en el paciente, que son capaces de reconocer y matar específicamente las células enfermas. En contraste, la inmunización pasiva se basa en la transferencia adoptiva de células T, que fueron expandidas y opcionales genéticamente diseñadas in vitro (terapia adoptiva de células T).

#### Vacunación

Las vacunas contra tumores tienen como objetivo inducir respuestas inmunitarias específicas de tumores endógenos mediante inmunización activa. Se pueden usar diferentes formatos de antígenos para la vacunación de tumores, incluidas células cancerosas completas, proteínas, péptidos o vectores inmunizantes, como ARN, ADN o vectores virales que se pueden aplicar directamente in vivo o in vitro pulsando las CD después de la transferencia al paciente.

El número de estudios clínicos en los que se puede identificar la respuesta inmunitaria inducida por terapia aumenta constantemente debido a las mejoras en las estrategias de inmunización y los métodos para la detección de respuestas inmunitarias específicas de antígeno (Connerotte, T. et al. (2008). *Cancer Res.* 68, 3931-3940; Schmitt, M. et al. (2008) *Blood* 111, 1357-1365; Speiser, D.E. et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 3849-3854; Adams, S. et al. (2008) *J. Immunol.* 181, 776-784).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, las respuestas inmunitarias detectadas no pueden correlacionarse sistémicamente con los resultados clínicos (Curigliano, G. et al. (2006) *Ann. Oncol.* 17, 750-762; Rosenberg, S. A. et al. (2004) *Nat. Medicina.* 10, 909-915).

La definición exacta de epítomos peptídicos derivados de antígenos tumorales puede contribuir, por lo tanto, a mejorar la especificidad y la eficacia de las estrategias de vacunación, así como los métodos para el control inmunológico.

#### Transferencia de células adoptivas (ACT)

La inmunoterapia basada en ACT puede definirse ampliamente como una forma de inmunización pasiva con células T previamente sensibilizadas que se transfieren a receptores no inmunes o al huésped autólogo después de la expansión ex vivo de bajas frecuencias de precursores a números de células clínicamente relevantes. Los tipos de células que se han utilizado para los experimentos de ACT son linfocitos citotóxicos activados por linfocinas (LAK) (Mule, J. J. et al. (1984) *Science* 225, 1487-1489; Rosenberg, S. A. et al. (1985) *N. Engl. J. Med.* 313, 1485-1492), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) (Rosenberg, S. A. et al. (1994) *J. Natl. Inst. Cáncer* 86, 1159-1166), linfocitos del donante después del trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH), así como estirpes o clones de células T específicas del tumor (Dudley, M. E. et al. (2001) *J. Immunother.* 24, 363-373; Yee, C. et al. (2002) *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A* 99, 16168-16173). Se demostró que la transferencia adoptiva de células T tiene actividad terapéutica contra las infecciones virales humanas, como el CMV. Si bien la infección por CMV y la reactivación de virus latentes endógenos están controlados por el sistema inmunitario en individuos sanos, produce una morbilidad y mortalidad significativas en individuos inmunocomprometidos, como receptores de trasplantes o pacientes con SIDA.

Riddell y sus colaboradores demostraron la reconstitución de la inmunidad viral mediante la terapia adoptiva con células T en pacientes inmunodeprimidos después de la transferencia de clones de células T específicas de CMV CD8+ derivados de donantes de trasplantes seropositivos CMV compatibles con HLA (Riddell, SR (1992) *Science* 257, 238-241).

Como un enfoque alternativo, las poblaciones de células T específicas de CMV o EBV derivadas de donantes policlonales se transfirieron a receptores de trasplantes, lo que resultó en una mayor persistencia de las células T transferidas (Rooney, C. M. et al. (1998) *Blood* 92, 1549-1555; Peggs, K. S. et al. (2003) *Lancet* 362, 1375-1377).

Para la inmunoterapia adoptiva del melanoma, Rosenberg y sus colaboradores establecieron un enfoque de ACT basado en la infusión de linfocitos infiltrantes de tumores autólogos (TIL) expandidos in vitro aislados de tumores extirpados en combinación con una quimioterapia de supresión linfática no mieloablativa e IL2 de dosis alta. Un estudio clínico publicado recientemente dio como resultado una tasa de respuesta objetiva del ~50% de los pacientes tratados con melanoma metastásico (Dudley, M. E. et al. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23: 2346-2357).

Sin embargo, los pacientes deben cumplir con varias premisas para ser elegibles para la inmunoterapia con ACT. Deben tener tumores resecables. Los tumores deben generar TIL viables en condiciones de cultivo celular. Los TIL deben ser reactivos contra los antígenos tumorales y deben expandirse in vitro hasta un número suficiente. Especialmente en otros cánceres distintos del melanoma, es difícil obtener tales TIL reactivos a tumores. Además, la estimulación in vitro repetida y la expansión clónica de los linfocitos T humanos normales dan como resultado una disminución progresiva de la actividad de la telomerasa y un acortamiento de los

telómeros, lo que resulta en una senescencia replicativa y un potencial disminuido de persistencia de las células T transferidas (Shen, X. et al. (2007) *J. Immunother.* 30: 123-129).

ACT utilizando células T de ingeniería genética

Un enfoque que supera las limitaciones de la ACT es la transferencia adoptiva de células T autólogas reprogramadas para expresar un inmunorreceptor reactivo al tumor de especificidad definida durante el cultivo ex vivo a corto plazo, seguido de una reinfusión en el paciente (Kershaw M. H. et al. (2013) *Nature Reviews Cancer* 13(8): 525-41). Esta estrategia hace que la ACT se aplique a una variedad de tumores malignos comunes, incluso si las células T reactivas al tumor están ausentes en el paciente. Dado que la especificidad antigénica de las células T se basa completamente en el complejo heterodimérico de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR, la transferencia de los genes de TCR clonados a las células T ofrece la posibilidad de redirigirlos hacia cualquier antígeno de interés. Por lo tanto, la terapia génica TCR proporciona una estrategia atractiva para desarrollar inmunoterapia específica de antígeno con linfocitos autólogos como opción de tratamiento. Las principales ventajas de la transferencia génica de TCR son la creación de cantidades terapéuticas de células T específicas de antígeno en unos pocos días y la posibilidad de introducir especificidades que no están presentes en el repertorio endógeno de TCR del paciente.

Varios grupos demostraron que la transferencia del gen TCR es una estrategia atractiva para redireccionar la especificidad de antígeno de las células T primarias (Morgan, R.A. et al. (2003) *J. Immunol.* 171, 3287-3295; Cooper, L.J. et al. (2000) *J. Virol.* 74, 8207-8212; Fujio, K. et al. (2000) *J. Immunol.* 165, 528-532; Kessels, H.W. et al. (2001) *Nat. Immunol.* 2, 957-961; Dembic, Z. et al. (1986) *Nature* 320, 232-238).

Rosenberg y su grupo demostraron recientemente la viabilidad de la terapia génica con TCR en humanos en ensayos clínicos para el tratamiento del melanoma maligno. La transferencia adoptiva de linfocitos autólogos transducidos retrovíricamente con TCR específicos de antígeno melanoma/melanocito resultó en una regresión del cáncer en hasta el 30% de los pacientes tratados con melanoma (Morgan, R. A. et al. (2006) *Science* 314, 126-129; Johnson, L. A. et al. (2009) *Blood* 114, 535-546).

Receptores de antígenos quiméricos

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR) son receptores diseñados que combinan un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo monoclonal con una parte intracelular que consta de uno o más dominios de señalización para la activación de las células T. Las CAR reconocen los antígenos nativos de una manera no restringida por el MHC y, por lo tanto, pueden usarse en todos los individuos sin importar cuál sea su tipo de HLA y son funcionales en células CD4+ así como en células T CD8+.

En la última década, se ha informado sobre una gran cantidad de CAR que apuntan a un panel de diferentes antígenos tumorales de la superficie celular. Sus funciones biológicas mejoraron drásticamente al incorporar un dominio coestimulador que dio como resultado receptores tripartitos (scFv, CD28, CD3 $\zeta$ ), denominados CAR de 2ª generación. Los CAR de la 3ª generación abarcan dominios adicionales de moléculas coestimuladoras, como OX40 y 4-1 BB para mejorar la capacidad proliferativa y la persistencia de las células T modificadas (Figura 2).

Estructuras objetivo para inmunoterapia específica de antígeno

El descubrimiento de múltiples antígenos asociados a tumores (TAA) ha proporcionado la base para los conceptos de inmunoterapia específicos de antígeno (Novellino, L. et al. (2005) *Cáncer Immunol. Immunother.* 54, 187-207). Los TAA son proteínas inusuales expresadas en células tumorales debido a su inestabilidad genética, que tienen una expresión nula o limitada en células normales. Estos TAA pueden conducir a un reconocimiento específico de células malignas por parte del sistema inmunitario.

Clonación molecular de los TAA mediante la selección de bibliotecas de expresión de ADNc derivadas de tumores utilizando células T autólogas específicas de tumores (van der Bruggen, P. y otros (1991) *Science* 254, 1643-1647) o anticuerpos circulantes (Sahin, U. et al. (1995) *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A* 92, 11810-11813), enfoques de inmunología inversa, métodos bioquímicos (Hunt, D. F. et al. (1992) *Science* 256, 1817-1820), análisis de expresión génica o estrategias de clonación in silico (Helftenbein, G. et al. (2008) *Gene* 414, 76-84) condujo a un número significativo de candidatos objetivo para estrategias inmunoterapéuticas. Los TAA se clasifican en varias categorías, incluidos los antígenos de diferenciación, los antígenos sobreexpresados, las variantes de empalme específicas de los tumores, los productos génicos mutados, los antígenos de testículos víricos y de cáncer (CTA). La familia de testículos de cáncer es una categoría muy prometedora de TAA, ya que su expresión está restringida a los testículos y una multitud de diferentes entidades tumorales (Scanlan, M. J. et al. (2002) *Immunol. Rdo.* 188, 22-32). Hasta ahora se han descrito más de 50 genes de CT (Scanlan, M. J. et al. (2004) *Cancer Immun.* 4, 1) y algunos de ellos se han abordado en estudios clínicos (Adams, S. et al. (2008) *J. Immunol.* 181, 776-784; Atanackovic, D. et al. (2004) *J. Immunol.* 172, 3289-3296; Chen, Q. et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 9363-9368; Connerotte, T. et al. (2008) *Cancer Res.* 68, 3931-3940; Davis, I.D. et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10697-10702; Jager, E. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A 97, 12198-12203; Marchand, M. et al. (1999) Int. J. Cancer 80, 219-230; Schuler-Thurner, B. et al. (2000) J. Immunol. 165, 3492-3496).

A pesar del número creciente de estructuras objetivo atractivas para los enfoques inmunoterapéuticos, existen clones específicos de células T o líneas de restricción de HLA definidas para algunos de ellos (Chaux, P. et al. (1999) J. Immunol. 163, 2928-2936; Zhang, Y. et al. (2002) Tissue Antigens 60, 365-371; Zhao, Y. et al. (2005) J. Immunol. 174, 4415-4423).

Las claudinas son proteínas integrales de membrana ubicadas dentro de las uniones estrechas de epitelios y endotelios. Se predice que las claudinas tienen cuatro segmentos transmembrana con dos bucles extracelulares y los terminales N y C ubicados en el citoplasma. La familia Claudina (CLDN) de proteínas transmembrana desempeña una función fundamental en el mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales y endoteliales y también podría desempeñar una función en el mantenimiento del citoesqueleto y en la señalización celular.

Claudina-6 (CLDN6) es un gen oncofetal expresado en células madre murinas y humanas, así como en cuerpos embrioides comprometidos con el destino de las células epiteliales (Turksen, K. et al. (2001) Dev Dyn 222, 292-300; Anderson WJ. et al. (2008) Dev Dyn 237, 504-12; Turksen K. et al. (2002) Development, 129, 1775-84; Assou S. et al. (2007) Stem Cells 25, 961-73). Como antígeno asociado a un tumor, se puede clasificar como un antígeno de diferenciación debido a su expresión durante la etapa temprana de la morfogénesis epidérmica, donde es crucial para la diferenciación epidérmica y la formación de barrera. Además, se observó expresión en los tejidos epiteliales o en el tejido epitelial normal neonatal de la lengua, la piel, el estómago y las mamas (Abuazza G. et al. (2006), Am J Physiol Renal Physiol 291, 1132-1141; Troy T.C. et al. (2007), Molecular Biotechnology 36, 166-74; Zhao L. et al. (2008), Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294, 1856-1862). Además, los datos propios también revelan una expresión baja o muy baja de CLDN6 en la placenta humana, la vejiga urinaria, el endometrio, la próstata y el nervio periférico y la sobreexpresión frecuente de CLDN6 en diferentes cánceres. Se ha demostrado que CLDN6 está sobreexpresado en tumores, incluidos los tumores cerebrales pediátricos, los adenocarcinomas gástricos y los tumores de células germinales, así como los carcinomas viscerales como los carcinomas ováricos (Figura 4). También se ha demostrado que la sobreexpresión de CLDN6 en células de cáncer gástrico produce un aumento de la invasividad, la migración y la proliferación, lo que sugiere que CLDN6 es un marcador de mal pronóstico y puede desempeñar una función potencial en el mantenimiento del fenotipo maligno. Además, se ha demostrado que el CLDN6 funciona como supresor del cáncer mediante la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis en estirpes celulares de cáncer de mama.

La sobreexpresión frecuente de CLDN6 en tumores califica a esta molécula como un objetivo altamente atractivo para el desarrollo de terapéuticos dirigidos contra CLDN6, como la terapéutica de vacunas y los anticuerpos terapéuticos. Los péptidos de unión a MHC inmunogénicos derivados de CLDN6, y su uso para generar anticuerpos específicos, receptores de células T y linfocitos T citolíticos, se han descrito en el documento WO2010/094499. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CLDN6, que tienen dominios variables que comprenden las SEQ ID NO: 32 (VH) y 33 (VL) respectivos se describen en el documento WO2011/057788, y los que comprenden las SEQ ID NO: 32 (VH) y 33, 38 o 39 (VL) en el documento WO2012/156018. Sin embargo, hasta ahora no se han descrito epítomos de células T CLDN6 restringidas a HLA-A\*2 y receptores de células T dirigidos a CLDN6 y se desconoce si las células de cáncer que expresan CLDN6 pueden ser atacadas in vivo por inmunoterapias que involucren células T que utilizan enfoques de inmunización activa o pasiva.

Descripción

Resumen de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Se basa en la siguiente enseñanza y sus diversos aspectos y realizaciones:

Resumen de la enseñanza

La presente enseñanza se refiere a receptores de células T y receptores artificiales de células T específicos para el antígeno CLDN6 asociado a tumores, en particular cuando están presentes en la superficie de una célula tal como una célula enferma o presentados en la superficie de una célula tal como una célula enferma o una célula presentadora de antígeno, así como péptidos que comprenden epítomos reconocidos por estos receptores de células T, es decir, epítomos de células CLDN6-T.

Por transferencia adoptiva de células T diseñadas para expresar dicho receptor artificial de células T o receptor de células T CLDN6 que expresa células cancerosas puede dirigirse específicamente, lo que conduce a la destrucción selectiva de células cancerosas. Además, los epítomos de células T proporcionados de acuerdo con la enseñanza son útiles para diseñar vacunas contra los cánceres que expresan CLDN6.

En un aspecto, la enseñanza se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

5 En una realización, el péptido tiene 100 o menos, 50 o menos, 20 o menos, o 10 o menos aminoácidos de longitud. En una realización, el péptido puede procesarse para producir un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

10 En una realización, el péptido es un péptido presentado de MHC de clase I o clase II, preferiblemente un péptido presentado de MHC de clase I, o, si está presente dentro de las células, puede procesarse para producir un producto de procesión del mismo que es un péptido presentado de MHC de clase I o clase II, preferiblemente un péptido presentado de MHC de clase I. Preferiblemente, dicho péptido presentado de MHC de clase I o clase II tiene una secuencia que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos dada, es decir,  
15 una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, un péptido de acuerdo con la enseñanza es capaz de estimular una respuesta celular contra una enfermedad que involucra células caracterizadas por la presentación de CLDN6 con MHC de clase I.

20 En aspectos adicionales, la enseñanza se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la enseñanza y a una célula que comprende el ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico recombinante. El ácido nucleico puede estar presente en un plásmido o en un vector de expresión y puede estar ligado funcionalmente a un promotor. En una realización, el ácido nucleico es ARN. Preferiblemente, la célula expresa el péptido. La célula puede ser una célula recombinante y puede secretar el péptido codificado o un producto de procesión del mismo, puede expresarlo en la superficie  
25 y preferiblemente puede expresar adicionalmente una molécula MHC que se une a dicho péptido o un producto de procesión del mismo y preferiblemente presenta dicho péptido o Producto de procesión del mismo sobre la superficie celular. En una realización, la célula expresa la molécula MHC de manera endógena. En una realización adicional, la célula expresa la molécula MHC y/o el péptido de una manera recombinante. La célula es preferiblemente no proliferativa. En una realización preferida, la célula es una célula presentadora de  
30 antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a una célula que presenta el péptido de la enseñanza o un producto de procesión del mismo, en el que el producto de procesión es preferiblemente un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos dada, es decir, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que  
35 consiste en SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, dicha célula es una célula que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la enseñanza. Preferiblemente, dicha célula expresa dicho ácido nucleico para producir dicho péptido. Opcionalmente, dicha célula procesa dicho péptido para producir un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. La célula puede presentar el péptido o un producto de procesión del mismo  
40 por moléculas MHC en su superficie. En una realización, la célula expresa endógenamente una molécula de MHC. En una realización adicional, la célula expresa de forma recombinante una molécula de MHC. En una realización, las moléculas MHC de la célula se cargan (pulsan) con el péptido mediante la adición del péptido a la célula. La célula puede expresar de forma recombinante el péptido y presentar dicho péptido o un producto de procesión del mismo en la superficie celular. La célula es preferiblemente no proliferativa. En una realización preferida, la célula es una célula presentadora de antígeno tal como una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.  
45

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a una célula inmunorreactiva que es reactiva con un péptido de la enseñanza, en particular cuando se presenta en la superficie de una célula tal como una célula enferma. La célula inmunorreactiva puede ser una célula que ha sido sensibilizada in vitro para reconocer el péptido. La  
50 célula inmunorreactiva puede ser una célula T, preferiblemente una célula T citotóxica. Preferiblemente, la célula inmunorreactiva se une a una secuencia que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos dada, es decir, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos, en particular cuando se une a MHC tal como MHC en la superficie de una célula tal como una célula enferma.

55 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un agente de unión que se une a un péptido de la enseñanza, opcionalmente en un complejo con una molécula de MHC.

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un receptor de células T que se une a un péptido de la enseñanza, opcionalmente en un complejo con una molécula de MHC, y preferiblemente es reactivo con dicho péptido, o una cadena polipeptídica de dicho receptor de células T. En una realización, la cadena polipeptídica

de dicho receptor de células T es una cadena  $\alpha$  del receptor de células T o una cadena  $\beta$  del receptor de células T.

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a una cadena  $\alpha$  del receptor de células T o un receptor de células T que comprende dicha cadena  $\alpha$  del receptor de células T, en el que dicha cadena  $\alpha$  del receptor de células T se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una cadena  $\alpha$  del receptor de células T que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente todas las tres secuencias CDR de una cadena  $\alpha$  del receptor de células T seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 o una variante de los mismos y

(ii) una cadena  $\alpha$  del receptor de células T que comprende una secuencia de la cadena  $\alpha$  del receptor de células T seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 o un fragmento del mismo, o una variante de dicha secuencia o fragmento.

En una realización, dichas SEQ ID NO: se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En una realización, dichas SEQ ID NO: se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24 y 26 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En una realización, dicha SEQ ID NO: es la SEQ ID NO: 28 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a una cadena  $\beta$  del receptor de células T o un receptor de células T que comprende dicha cadena  $\beta$  del receptor de células T, en la que dicha cadena  $\beta$  del receptor de células T se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una cadena  $\beta$  del receptor de células T que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente todas las tres de las secuencias CDR de una cadena  $\beta$  del receptor de células T seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 y 29 o una variante de los mismos y

(ii) una cadena  $\beta$  del receptor de células T que comprende una secuencia de la cadena  $\beta$  del receptor de células T seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 y 29 o un fragmento del mismo, o una variante de dicha secuencia o fragmento.

En una realización, dichas SEQ ID NO: se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15 y 17 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En una realización, dichas SEQ ID NO: se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25 y 27 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En una realización, dicha SEQ ID NO: es la SEQ ID NO: 29 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un receptor de células T seleccionado del grupo que consiste en:

(I) un receptor de células T que comprende:

(i) una cadena  $\alpha$  del receptor de células T que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente todas las tres de las secuencias CDR de la cadena  $\alpha$  del receptor de células T de la SEQ ID NO: x o una variante de la misma, y

(ii) una cadena  $\beta$  del receptor de células T que comprende al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente todas las tres de las secuencias CDR de una cadena  $\beta$  del receptor de células T de la SEQ ID NO: x+1 o una variante de la misma; en el que x se selecciona del grupo que consiste en 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 y

(II) un receptor de células T que comprende:

(i) una cadena  $\alpha$  del receptor de células T que comprende la secuencia de la cadena  $\alpha$  del receptor de células T de la SEQ ID NO: x o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento, y

(ii) una cadena  $\beta$  del receptor de células T que comprende la secuencia de la cadena  $\beta$  del receptor de células T de la SEQ ID NO: x+1 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento;

5 en la que x se selecciona del grupo que consiste en 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28.

En una realización, dicho x se selecciona del grupo que consiste en 6, 8, 10, 12, 14 y 16 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

10 En una realización, dicha x se selecciona del grupo que consiste en 18, 20, 22, 24 y 26 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una variante de dicha secuencia de aminoácido.

En una realización, dicho x es 28 y dicho receptor de células T es reactivo con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

15 En una realización, la unión de dicho receptor de células T cuando se expresa por células T y/o está presente en células T a epítomos de péptido CLDN6 como se describió anteriormente presentado en células tales como células cancerosas da como resultado la proliferación y/o activación de dichas células T, en el que dichas células T activadas liberan preferiblemente factores citotóxicos, por ejemplo, perforinas y granzimas, e inician la citólisis y/o la apoptosis de las células cancerosas.

20 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un receptor artificial de células T que se une a la claudina-6 (CLDN6). En una realización, la unión es una unión específica.

En una realización, dicho CLDN6 se expresa en una célula cancerosa. En una realización, dicho CLDN6 se expresa en la superficie de una célula cancerosa. En una realización, dicho receptor artificial de células T se une a un dominio extracelular o a un epítipo en un dominio extracelular de CLDN6. En una realización, dicho receptor artificial de células T se une a epítomos nativos de CLDN6 presentes en la superficie de células vivas.

25 En una realización, dicho receptor artificial de células T se une al primer bucle extracelular de CLDN6. En una realización, la unión de dicho receptor artificial de células T cuando se expresa por células T y/o está presente en células T a CLDN6 presente en células tales como células cancerosas da como resultado la proliferación y/o activación de dichas células T, en el que dichas células T activadas liberan preferiblemente factores citotóxicos, por ejemplo, perforinas y granzimas, e inician la citólisis y/o la apoptosis de las células cancerosas.

30 En una realización, el receptor artificial de células T de la enseñanza comprende un dominio de unión para CLDN6. En una realización, el dominio de unión para CLDN6 está comprendido por un exodominio de dicho receptor artificial de células T. En una realización, el dominio de unión para CLDN6 comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo CLDN6. En una realización, el dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una especificidad para CLDN6 (VH(CLDN6)) y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una Especificidad para CLDN6 (VL(CLDN6)). En una realización, dicha región variable de cadena pesada (VH) y la correspondiente región variable de cadena ligera (VL) están conectadas a través de un enlazador peptídico, preferiblemente un enlazador peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos (GGGGS)<sup>3</sup>. En una realización, el dominio de unión para CLDN6 comprende un VH(CLDN6) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento. En una realización, el dominio de unión para CLDN6 comprende un VL(CLDN6) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33, 38 o 39 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento de aminoácido. En una realización, el dominio de unión para CLDN6 comprende un VH(CLDN6) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento y una VL(CLDN6) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento de aminoácidos. En una realización, el dominio de unión para CLDN6 comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 40 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento de aminoácidos.

40 En una realización, el receptor artificial de células T de la enseñanza comprende un dominio transmembrana. En una realización, el dominio transmembrana es una hélice alfa hidrófoba que se extiende por la membrana. En una realización, el dominio transmembrana comprende el dominio transmembrana CD28 o un fragmento del mismo.

55 En una realización, el receptor artificial de células T de la enseñanza comprende un dominio de señalización de células T. En una realización, el dominio de señalización de células T está localizado intracelularmente. En una realización, el dominio de señalización de células T comprende CD3-zeta, preferiblemente el endodominio de CD3-zeta, opcionalmente en combinación con CD28. En una realización, el dominio de señalización de



células T comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 45 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento.

5 En una realización, el receptor artificial de células T de la enseñanza comprende un péptido señal que dirige la proteína naciente hacia el retículo endoplásmico. En una realización, el péptido señal precede al dominio de unión para CLDN6. En una realización, el péptido señal comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 42 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento.

10 En una realización, el receptor artificial de células T de la enseñanza comprende una región separadora que une el dominio de unión para CLDN6 al dominio transmembrana. En una realización, la región separadora permite que el dominio de unión para CLDN6 se oriente en diferentes direcciones para facilitar el reconocimiento de CLDN6. En una realización, la región separadora comprende la región bisagra de IgG1. En una realización, la región separadora comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 43 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento.

En una realización, el receptor artificial de células T de la enseñanza comprende la estructura:

15 NH2: péptido señal, dominio de unión para CLDN6, región separadora, dominio transmembrana, dominio de señalización de células T, COOH.

En una realización, el receptor artificial de células T de la enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 46 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento de aminoácidos.

20 Los receptores de células T anteriores y los receptores artificiales de células T son preferiblemente específicos para el antígeno CLDN6 asociado a tumores, en particular cuando están presentes en la superficie de una célula como una célula enferma o cuando se presentan en la superficie de una célula tal como una célula enferma o una célula presentadora de antígeno.

Los receptores de células T y los receptores artificiales de células T de la enseñanza pueden expresarse por y/o presentes en la superficie de células tales como las células T.

25 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena del receptor de células T o el receptor de células T de la enseñanza o que codifica el receptor artificial de células T de la enseñanza. En una realización, el ácido nucleico es un ácido nucleico recombinante. En una realización, el ácido nucleico está en forma de un vector o en forma de ARN.

30 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a una célula que comprende la cadena del receptor de células T o el receptor de células T de la enseñanza o el receptor artificial de células T de la enseñanza y/o que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena del receptor de células T o el receptor de células T de la enseñanza o que codifica el receptor artificial de células T de la enseñanza. En una realización, dicho ácido nucleico es ARN, preferiblemente ARN transcrito in vitro. La célula puede ser una célula que expresa la cadena del receptor de células T o el receptor de células T de la enseñanza o el receptor artificial de células T de la enseñanza y/o puede tener la cadena del receptor de células T o el receptor de células T de la enseñanza o el receptor de célula T artificial de la enseñanza sobre su superficie celular. En una realización, dicha célula es una célula que es útil para la transferencia de células adoptiva. La célula puede ser una célula madre o efectora, preferiblemente una célula inmunorreactiva. La célula inmunorreactiva puede ser una célula T, preferiblemente una célula T citotóxica. En una realización, la célula  
35 inmunorreactiva es reactiva con el antígeno asociado a tumor CLDN6. En una realización, dicho CLDN6 está presente en la superficie de una célula tal como una célula enferma. En una realización, dicho CLDN6 se presenta en la superficie de una célula tal como una célula enferma o una célula presentadora de antígeno, y la célula inmunorreactiva es reactiva con un péptido de la enseñanza, en particular cuando se presenta en el contexto de MHC, y preferiblemente se une a una secuencia que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos dada, es decir, una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. En una realización, dicha célula carece de expresión superficial de un TCR endógeno o es específica para un antígeno no relacionado con CLDN6.

40 En una realización, las células de la enseñanza antes del uso en la transferencia de células adoptiva se someten a una expansión y respuesta a antígeno específicas, en el que la expansión y respuesta a antígeno específicas pueden efectuarse exponiendo las células a células presentadoras de antígeno preferiblemente autólogas que presentan CLDN6 o un fragmento peptídico del mismo.

55 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un método para producir una célula inmunorreactiva que comprende la etapa de transducir una célula T con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena del receptor de células T o el receptor de células T de la enseñanza o que codifica el receptor artificial de células T de la enseñanza.

Además, la presente enseñanza generalmente abarca el tratamiento de enfermedades dirigiéndose a células enfermas tales como células cancerosas, en particular células cancerosas que expresan CLDN6. Los métodos proporcionan la erradicación selectiva de las células que se expresan en su superficie y/o presentan el antígeno CLDN6 asociado al tumor, minimizando así los efectos adversos para las células normales que no expresan y/o presentan CLDN6. Por lo tanto, las enfermedades preferidas para una terapia son aquellas en las que CLDN6 se expresa y se presenta opcionalmente, tales como enfermedades de cáncer, en particular las descritas en este documento.

Cuando se administra un péptido de la enseñanza, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la enseñanza o una célula de la enseñanza que comprende dicho ácido nucleico, el tratamiento implica preferiblemente una inmunización activa. Preferiblemente, las células T específicas de CLDN6 se expanden en el paciente, las cuales son capaces de reconocer y matar células enfermas. Cuando una célula inmunorreactiva de la enseñanza, un receptor de células T de la enseñanza, un receptor artificial de células T de la enseñanza, un ácido nucleico de la enseñanza comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de células T de la enseñanza o que codifica un receptor artificial de células T de la enseñanza o una célula de la enseñanza que comprende un receptor de células T o un receptor artificial de células T de la enseñanza y/o que comprende un ácido nucleico de la enseñanza que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de células T de la enseñanza o que codifica un receptor artificial de células T se administra, el tratamiento implica preferiblemente una inmunización pasiva. Preferiblemente, las células T específicas de CLDN6 que son capaces de reconocer y matar células enfermas y que fueron opcionalmente diseñadas genéticamente y/o expandidas in vitro se transfieren de forma adoptiva a un paciente.

En un aspecto, la enseñanza se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más de:

- (i) el péptido de la enseñanza;
- (ii) el ácido nucleico de la enseñanza;
- (iii) la célula de la enseñanza;
- (iv) la célula inmunorreactiva de la enseñanza;
- (v) el agente de unión de la enseñanza
- (vi) el receptor de células T de la enseñanza; y
- (vi) el receptor artificial de células T de la enseñanza.

Una composición farmacéutica de la enseñanza puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y puede comprender opcionalmente uno o más adyuvantes, estabilizantes, etc. La composición farmacéutica puede estar en forma de una vacuna terapéutica o profiláctica. En una realización, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad de cáncer tal como las descritas en este documento.

La administración de una composición farmacéutica como se describió anteriormente puede proporcionar epítomos presentados en MHC de clase II que son capaces de provocar una respuesta de células T auxiliares CD4+ y/o una respuesta de células T CD8+ contra CLDN6 (incluidas las células que expresan CLDN6 en su superficie y/o presentan CLDN6) en el contexto de las moléculas MHC). Alternativa o adicionalmente, la administración de una composición farmacéutica como se describió anteriormente puede proporcionar epítomos presentados en MHC de clase I que son capaces de provocar una respuesta de células T CD8+ contra CLDN6.

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad de cáncer que comprende administrar a un paciente la composición farmacéutica de la enseñanza.

En un aspecto adicional, la enseñanza se relaciona con el péptido de la enseñanza, el ácido nucleico de la enseñanza, la célula de la enseñanza, la célula inmunorreactiva de la enseñanza, el agente de unión de la enseñanza, el receptor de células T de la enseñanza, o el receptor artificial de células T de la enseñanza para uso en terapia, en particular para uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

Otro aspecto se refiere a un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica de la enseñanza.

Otro aspecto se refiere a un método para estimular, cebar y/o expandir células T, que comprende poner en contacto células T con uno o más de: el péptido de la enseñanza, el ácido nucleico de la enseñanza que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la enseñanza, la célula de la enseñanza que comprende dicho ácido nucleico y/o la célula de la enseñanza que presenta el péptido de la enseñanza o un producto de procesamiento del mismo. En una realización, el péptido de la enseñanza se presenta en el contexto

de moléculas de MHC tales como moléculas de MHC en la superficie de las células, por ejemplo, células presentadoras de antígenos.

En este aspecto, la enseñanza puede relacionarse con un método para preparar células T específicas de CLDN6. Las células T pueden estimularse, cebarse y/o expandirse in vitro o in vivo. Preferiblemente, las células T están presentes en una muestra obtenida de un sujeto. Las células T estimuladas, cebadas y/o expandidas pueden administrarse a un sujeto y pueden ser autólogas, alogénicas, singénicas para el sujeto.

La enseñanza en los aspectos anteriores de un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto o de un método para estimular, cebar y/o expandir células T puede relacionarse con un método para tratar enfermedades de cáncer en un sujeto.

Otro aspecto se refiere a un método para destruir células cancerosas en un sujeto, que comprende la etapa de proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de la enseñanza, el ácido nucleico de la enseñanza, la célula de la enseñanza, la célula inmunoreactiva de la enseñanza, el agente de unión de la enseñanza, el receptor de células T de la enseñanza o el receptor artificial de células T de la enseñanza.

Las composiciones y agentes descritos en el presente documento son preferiblemente capaces de inducir o promover una respuesta celular, preferiblemente actividad de células T citotóxicas, contra una enfermedad caracterizada por la expresión de CLDN6 y/o la presentación de CLDN6 con MHC de clase I, por ejemplo, una enfermedad de cáncer.

En un aspecto, la enseñanza proporciona los agentes y composiciones descritos en el presente documento para uso en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

Los tratamientos de enfermedades de cáncer descritos en este documento pueden combinarse con resección quirúrgica y/o radiación y/o quimioterapia tradicional.

En otro aspecto, la enseñanza se refiere a un método para determinar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende determinar células T reactivas con un péptido de la enseñanza o una célula de la enseñanza que presenta un péptido de la enseñanza o un producto de procesamiento del mismo en una muestra biológica aislada del sujeto. El método puede comprender los pasos de:

(a) incubar una muestra que comprende células T aisladas de un sujeto con uno o más de:

(i) el péptido de la enseñanza;

(ii) el ácido nucleico de la enseñanza que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la enseñanza; y

(iii) la célula de la enseñanza que comprende dicho ácido nucleico o la célula de la enseñanza que presenta un péptido de la enseñanza o un producto de procesamiento del mismo;

y

(b) detectar la activación específica de las células T, determinando la presencia o ausencia de una respuesta inmunitaria en dicho sujeto.

La enseñanza en los aspectos anteriores de un método para determinar una respuesta inmunitaria en un sujeto puede relacionarse con un método para diagnosticar enfermedades de cáncer en un sujeto.

En una realización de los métodos para el diagnóstico, la muestra biológica es de un tejido u órgano en el que las células cuando el tejido u órgano está libre de enfermedad no expresan sustancialmente CLDN6.

Típicamente, el nivel de células T en una muestra biológica se compara con un nivel de referencia, en el que una desviación de dicho nivel de referencia es indicativa de la presencia y/o etapa de una enfermedad en un sujeto. El nivel de referencia puede ser un nivel determinado en una muestra de control (por ejemplo, de un tejido o sujeto sano) o un nivel mediano de sujetos saludables. Una "desviación" de dicho nivel de referencia designa cualquier cambio significativo, como un aumento de al menos 10%, 20% o 30%, preferiblemente de al menos 40% o 50%, o incluso más. Preferiblemente, la presencia de células T en dicha muestra biológica o una cantidad de células T en la muestra biológica que se incrementa en comparación con un nivel de referencia indica la presencia de una enfermedad.

Las células T pueden aislarse de la sangre periférica del paciente, los ganglios linfáticos, muestras de tejido, como las derivadas de biopsias y resecciones u otras fuentes. Los ensayos de reactividad pueden realizarse en células T primarias u otros derivados apropiados. Por ejemplo, las células T pueden fusionarse para generar hibridomas. Los ensayos para medir la capacidad de respuesta de las células T son conocidos en la técnica e incluyen ensayos de proliferación y ensayos de liberación de citoquinas.

Los ensayos e índices para detectar células T reactivas incluyen, entre otros, el uso de IFN $\gamma$  ELISPOT y la tinción de citoquinas intracelulares IFN $\gamma$ . Otros métodos diversos son conocidos en la técnica para determinar si un clon de células T responderá a un péptido particular. Normalmente, el péptido se añade a una suspensión de las células T durante un período de uno a tres días. La respuesta de las células T puede medirse por proliferación, por ejemplo, captación de timidina etiquetada, o por liberación de citoquinas, por ejemplo, IL-2. Se dispone de varios ensayos para detectar la presencia de citoquinas liberadas. Se pueden usar ensayos citotóxicos de células T para detectar células T citotóxicas que tienen especificidad por antígenos. En una realización, las células T citotóxicas se analizan para determinar su capacidad para matar células diana que presentan un antígeno con moléculas MHC de clase I. Las células diana que presentan un antígeno pueden etiquetarse y agregarse a una suspensión de células T de una muestra de paciente. La citotoxicidad se puede medir cuantificando la liberación de etiqueta de células lisadas. Los controles para la liberación espontánea y total pueden incluirse en el ensayo.

En una realización de la enseñanza, un cáncer descrito en el presente documento implica células cancerosas que expresan CLDN6 y/o que presentan CLDN6 en el contexto de moléculas de MHC. En una realización de la enseñanza, las células enfermas son células cancerosas. En una realización, las células enfermas, tales como las células cancerosas, son células que expresan CLDN6 y/o presentan CLDN6 en el contexto de las moléculas MHC. En una realización, la expresión de CLDN6 está en la superficie de una célula enferma.

En una realización de la enseñanza, se selecciona un cáncer del grupo que consiste en cáncer de vejiga urinaria, cáncer de ovario, en particular adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular carcinoma de pulmón epidermoide y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma epidermoide, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular carcinoma de células de transición y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, que incluyen carcinoma de células renales y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer del intestino delgado, que incluye cáncer de íleon, en particular el adenocarcinoma de intestino delgado y el adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, tumores de células germinales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, cáncer de células germinales en particular de los testículos, y sus formas metastásicas.

En una realización de la enseñanza, las células cancerosas son células cancerosas de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga urinaria, cáncer de ovario, en particular adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular carcinoma de pulmón epidermoide y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma epidermoide, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomorfo maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular carcinoma de células de transición y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, que incluye carcinoma de células renales y carcinoma de células renales papilares, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer del intestino delgado, que incluye cáncer de íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma del íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, tumores de células germinales, como un teratocarcinoma o carcinoma embrionario, en particular tumores de células germinales del testículo, y las formas metastásicas de los mismos.

De acuerdo con la enseñanza, CLDN6 tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o 2.

Otras características y ventajas de la presente enseñanza serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

#### Descripción detallada

Aunque la presente enseñanza se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta enseñanza no está limitada a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente enseñanza, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

- A continuación, se describirán los elementos de la presente enseñanza. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos y las realizaciones preferidas descritos de manera diversa no deben interpretarse como limitantes de la presente enseñanza a solo las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción apoya y abarca las realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse revelada por la descripción de la presente solicitud, a menos que el contexto indique lo contrario.
- Preferiblemente, los términos utilizados aquí se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., (1995) Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza.
- La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique lo contrario, los métodos convencionales de bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en este campo (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).
- A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un miembro, entero, paso o grupo declarado de miembros, enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o paso o grupo de miembros, números enteros o pasos, aunque en algunas realizaciones se pueden excluir otros miembros, números enteros o pasos o grupos de miembros, números enteros o pasos, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro declarado, entero o paso o grupo de miembros, enteros o pasos. Los términos "un" y "una" y "la" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la enseñanza (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse de modo que cubran tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o claramente contradicho por el contexto. La mención de los rangos de valores en este documento tiene la intención de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se hubiera mencionado individualmente en este documento.
- Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en este documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en este documento, pretende simplemente ilustrar mejor la enseñanza y no plantea una limitación en el alcance de la enseñanza reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como un indicador de ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la enseñanza.
- El término "recombinante" en el contexto de la presente enseñanza significa "realizado mediante ingeniería genética". Preferiblemente, un "objeto recombinante" tal como una célula recombinante en el contexto de la presente enseñanza no está ocurriendo naturalmente.
- El término "que ocurre naturalmente" como se usa en este documento se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos los virus) y se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que el hombre no ha modificado intencionalmente en el laboratorio ocurre naturalmente.
- El término "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta corporal integrada a un antígeno y preferiblemente se refiere a una respuesta inmunitaria celular o una respuesta inmunitaria tanto celular como humoral. La respuesta inmunitaria puede ser protectora/preventiva/profiláctica y/o terapéutica.
- "Inducir una respuesta inmunitaria" puede significar que no hubo una respuesta inmunitaria contra un antígeno en particular antes de la inducción, pero también puede significar que hubo un cierto nivel de respuesta inmunitaria contra un antígeno en particular antes de la inducción y después de la inducción, dicha respuesta inmunitaria está mejorada. Por lo tanto, "inducir una respuesta inmunitaria" también incluye "mejorar una respuesta inmunitaria". Preferiblemente, después de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, dicho sujeto está protegido de desarrollar una enfermedad tal como una enfermedad de cáncer o la afección de la enfermedad se mejora mediante la inducción de una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se puede inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno asociado a un tumor, como el CLDN6, en un paciente con una enfermedad cancerosa o en un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad cancerosa. La inducción de una respuesta inmunitaria en este caso puede significar que la condición de la enfermedad del sujeto se mejora, que el sujeto no desarrolla metástasis o que el sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad de cáncer no desarrolla una enfermedad de cáncer.

Una “respuesta inmunitaria celular”, una “respuesta celular”, una “respuesta celular contra un antígeno” o un término similar pretende incluir una respuesta celular dirigida a células caracterizadas por la presentación de un antígeno con MHC de clase I o clase II. La respuesta celular se relaciona con células llamadas células T o linfocitos T que actúan como “ayudantes” o “agresores”. Las células T auxiliares (también llamadas células T CD4+) desempeñan una función central al regular la respuesta inmunitaria y los linfocitos citotóxicos (también llamadas células T citotóxicas, células T citolíticas, células T CD8+ o CTL) destruyen células enfermas como las células cancerígenas, previniendo la producción de más células enfermas.

El término “antígeno” se refiere a un agente que comprende un epítipo contra el cual se genera y/o se dirige una respuesta inmunitaria. Preferiblemente, un antígeno en el contexto de la presente enseñanza es una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, induce una reacción inmune, que es preferiblemente específica para el antígeno o células que expresan y/o presentan el antígeno. El término “antígeno” incluye en particular proteínas y péptidos. Un antígeno es preferiblemente un producto que corresponde o se deriva de un antígeno natural. Dichos antígenos naturales pueden incluir o pueden derivarse de antígenos asociados a tumores.

En particular, el antígeno o sus fragmentos peptídicos deben ser reconocibles por un receptor de células T. Preferiblemente, el antígeno o péptido, si es reconocido por un receptor de células T, es capaz de inducir en presencia de señales coestimuladoras apropiadas, la expansión clonal de las células T que llevan el receptor de células T que reconoce el antígeno o péptido. En el contexto de las realizaciones de la presente enseñanza, el antígeno se presenta preferiblemente por una célula, preferiblemente por una célula presentadora de antígeno y/o una célula enferma, en el contexto de moléculas de MHC, que pueden dar como resultado una reacción inmunitaria contra el antígeno. (o célula que presenta el antígeno).

En una realización preferida, un antígeno es un antígeno asociado a un tumor, es decir, un constituyente de células cancerosas que pueden derivarse del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, preferiblemente en gran cantidad, Intracelular o como antígenos de superficie en células cancerosas.

En el contexto de la presente enseñanza, el término “antígeno asociado a tumor” o “antígeno tumoral” se refiere a proteínas que se encuentran en condiciones normales expresadas específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas, por ejemplo, el antígeno asociado a tumor puede estar en condiciones normales expresadas específicamente en tejido estomacal, preferiblemente en la mucosa gástrica, en órganos reproductores, por ejemplo, en testículos, en tejido trofoblástico, por ejemplo, en placenta o en células de la línea germinal, y se expresan o Expresado aberrantemente en uno o más tejidos tumorales o cancerosos. En este contexto, “un número limitado” significa preferiblemente no más de 3, más preferiblemente no más de 2. Los antígenos asociados a tumores en el contexto de la presente enseñanza incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferiblemente antígenos de diferenciación específicos de tipo celular, es decir, proteínas que se encuentran en condiciones normales expresadas específicamente en un determinado tipo de célula en una cierta etapa de diferenciación, cáncer/antígenos de testículo, es decir, proteínas que se encuentran en condiciones normales expresadas específicamente en testículos y, a veces, en placenta, y antígenos específicos de la línea germinal. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno asociado a tumor se asocia preferiblemente con la superficie celular de una célula cancerosa y preferiblemente no se expresa o, raramente, se expresa en tejidos normales. Preferiblemente, el antígeno asociado a tumor o la expresión aberrante del antígeno asociado a tumor identifica células cancerosas. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno asociado a tumor que se expresa por una célula cancerosa en un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad de cáncer, es preferiblemente una autoproteína en dicho sujeto. En realizaciones preferidas, el antígeno asociado a tumor en el contexto de la presente enseñanza se expresa en condiciones normales específicamente en un tejido u órgano que no es esencial, es decir, tejidos u órganos que cuando son dañados por el sistema inmunitario no conducen a la muerte del sujeto, o en órganos o estructuras del cuerpo que no son o son difícilmente accesibles por el sistema inmunitario. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del antígeno asociado a tumor es idéntica entre el antígeno asociado a tumor que se expresa en tejidos normales y el antígeno asociado a tumor que se expresa en tejidos de cáncer. Preferiblemente, un antígeno asociado a tumor se presenta por una célula cancerosa en la que se expresa.

Varios aspectos de la enseñanza involucran el antígeno asociado al tumor CLDN6 y la presente enseñanza puede involucrar la estimulación o provisión de una reacción CTL antitumoral contra células cancerosas que expresan dicho antígeno asociado a tumor y que presentan preferiblemente dicho antígeno asociado a tumor con MHC de clase I.

Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones estrechas, donde establecen la barrera paracelular que controla el flujo de moléculas en el espacio intercelular entre las células de un epitelio. Las claudinas son proteínas transmembrana que atraviesan la membrana 4 veces con el extremo de terminal N y el extremo de terminal C, ambos ubicados en el citoplasma. El primer bucle extracelular, denominado EC1 o ECL1, consta de un promedio de 53 aminoácidos, y el segundo bucle extracelular, denominado EC2 o ECL2, consta de alrededor de 24 aminoácidos. Las proteínas de la superficie celular de la familia de las claudinas, como CLDN6, se expresan en tumores de diversos orígenes y son

particularmente adecuadas como estructuras objetivo en relación con la inmunoterapia del cáncer mediada por anticuerpos debido a su expresión selectiva (sin expresión en un tejido normal relevante para la toxicidad) y localización a la membrana plasmática.

5 CLDN6 ha sido identificado como expresado diferencialmente en tejidos tumorales, con los únicos tejidos normales que expresan CLDN6 que son placenta.

Se ha encontrado que CLDN6 se expresa, por ejemplo, en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de vías biliares, cáncer de células renales y cáncer de vejiga urinaria. CLDN6 es un  
 10 objetivo particularmente preferido para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de ovario, en particular el adenocarcinoma de ovario y el teratocarcinoma de ovario, el cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular carcinoma de células pulmonares y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma epidermoide, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y  
 15 carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células de transición y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, incluido el carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilar, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer de íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en  
 20 particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, tumores de células germinales como un teratocarcinoma o carcinoma embrionario, en particular tumores de células germinales del testículo, y las formas metastásicas de los mismos. En una realización, la enfermedad de cáncer asociada con la expresión de CLDN6 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de ovario metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferiblemente, el cáncer de ovario  
 25 es un carcinoma o un adenocarcinoma. Preferiblemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un adenocarcinoma, y preferiblemente es un cáncer bronquial tal como un carcinoma bronquial o un adenocarcinoma bronquial.

El término "CLDN" como se usa en este documento significa claudina e incluye CLDN6. Preferiblemente, una  
 30 claudina es una claudina humana. El término "CLDN6" se refiere a la claudina 6 e incluye cualquier variante de la misma.

El término "CLDN6" se refiere preferiblemente a CLDN6 humano y, en particular, a una proteína que comprende, preferiblemente consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 de la lista de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácido. El primer bucle extracelular de CLDN6  
 35 comprende preferiblemente los aminoácidos 28 a 80, más preferiblemente los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. El segundo bucle extracelular de CLDN6 comprende preferiblemente los aminoácidos 138 a 160, preferiblemente los aminoácidos 141 a 159, más preferiblemente los aminoácidos 145 a 157 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. Dichos primer y segundo bucles extracelulares forman preferiblemente la porción extracelular de CLDN6.

40 El término "variante" de acuerdo con la enseñanza se refiere, en particular, a mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están presentes de forma natural. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuyo significado a menudo no está claro. La secuenciación completa de genes a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia  
 45 de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de una secuencia de ácido nucleico o aminoácido dada. El término "variante" abarcará todas las variantes modificadas postraduccionalmente y las variantes de conformación.

De acuerdo con los diversos aspectos de la enseñanza, el objetivo es preferiblemente inducir o determinar una  
 50 respuesta inmunitaria contra las células cancerosas que expresan CLDN6 y preferiblemente caracterizarse por la presentación de CLDN6, y diagnosticar, tratar o prevenir una enfermedad cancerosa que involucre células que expresan CLDN6. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria implica la estimulación de una respuesta CTL anti-CLDN6 contra células cancerosas que expresan CLDN6 y preferiblemente presentan CLDN6 con MHC de clase I.

De acuerdo con la enseñanza, el término "cáncer positivo para CLDN6" o términos similares significa un cáncer  
 55 que involucra células cancerosas que expresan CLDN6, preferiblemente en la superficie de dichas células cancerosas. Alternativa o adicionalmente, dichas células cancerosas que expresan CLDN6 presentan CLDN6 en el contexto de moléculas MHC. Las células cancerosas que presentan CLDN6 en el contexto de las moléculas MHC pueden ser atacadas por células inmunorreactivas que llevan receptores de células T, mientras que las células cancerosas que expresan CLDN6 en la superficie pueden ser atacadas por células  
 60 inmunorreactivas que llevan receptores artificiales de células T.

La "superficie celular" se usa de acuerdo con su significado normal en la técnica, y por lo tanto incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión por proteínas y otras moléculas.

CLDN6 se expresa en la superficie de las células si está ubicado en la superficie de dichas células y es accesible para unirse a los anticuerpos específicos de CLDN6 agregados a las células.

- 5 El término "porción extracelular" o "exodominio" en el contexto de la presente enseñanza se refiere a una parte de una molécula tal como una proteína que se enfrenta al espacio extracelular de una célula y es preferiblemente accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por moléculas de unión a antígeno tales como anticuerpos localizados fuera de la célula. Preferiblemente, el término se refiere a uno o más bucles o dominios extracelulares o un fragmento de los mismos.
- 10 El término "porción" se refiere a una fracción. Con respecto a una estructura particular tal como una secuencia de aminoácidos o una proteína, el término "parte" de la misma puede designar una fracción continua o discontinua de dicha estructura. Preferiblemente, una porción de una secuencia de aminoácidos comprende al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente a al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70%,
- 15 incluso más preferiblemente al menos el 80%, y lo más preferiblemente al menos el 90% de los aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, si la porción es una fracción discontinua, dicha fracción discontinua está compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más partes de una estructura, cada parte es un elemento continuo de la estructura. Por ejemplo, una fracción discontinua de una secuencia de aminoácidos puede estar compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más, preferiblemente no más de 4 partes de dicha secuencia de aminoácidos,
- 20 en donde cada parte comprende preferiblemente al menos 5 aminoácidos continuos, al menos 10 aminoácidos continuos, preferiblemente al menos 20 aminoácidos continuos, preferiblemente al menos 30 aminoácidos continuos de la secuencia de aminoácidos.

- Los términos "parte" y "fragmento" se usan indistintamente en este documento y se refieren a un elemento continuo. Por ejemplo, una parte de una estructura como una secuencia de aminoácidos o una proteína se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. Una porción, una parte o un fragmento de una estructura comprende preferiblemente una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Por ejemplo, una porción,
- 25 una parte o un fragmento de un epítipo, péptido o proteína es preferiblemente inmunológicamente equivalente al epítipo, péptido o proteína de la que se deriva. En el contexto de la presente enseñanza, una "parte" de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos comprende preferiblemente, preferiblemente consiste en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50 %, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 98%, al menos 99 % de la estructura completa o secuencia de aminoácidos. Una parte o fragmento de una secuencia proteica comprende preferiblemente una secuencia de al menos 6, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia proteica. Las porciones, partes o fragmentos como se discutió anteriormente están abarcados por el término "variante" utilizado aquí.
- 30
- 35

- De acuerdo con la enseñanza, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión es menor en comparación con la expresión en células de placenta o tejido de placenta. Preferiblemente, el nivel de expresión es inferior al 10%, preferiblemente inferior al 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% o 0,05% de la expresión en células de placenta o tejido de placenta o incluso inferior. Preferiblemente, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en un tejido no canceroso distinto de la placenta en no más de 2 veces, preferiblemente 1.5 veces, y preferiblemente no excede el nivel de expresión en dicho tejido no canceroso. Preferiblemente, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado
- 40
- 45

- bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN6 agregados a las células.
- De acuerdo con la enseñanza, CLDN6 se expresa en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en tejido no canceroso distinto de la placenta, preferiblemente en más de 2 veces, preferiblemente 10 veces, 100 veces, 1000 veces, o 10000 veces. Preferiblemente, CLDN6 se expresa en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es lo suficientemente alto como
- 50

- para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN6 agregados a las células. Preferiblemente, el CLDN6 expresado en una célula se expresa o expone en la superficie de dicha célula.
- "Célula objetivo" se refiere a una célula que es un objetivo para una respuesta inmunitaria, como una respuesta inmunitaria celular. Las células diana incluyen células que presentan un antígeno o un epítipo antigénico, es decir, un fragmento peptídico derivado de un antígeno, e incluyen cualquier célula indeseable tal como una
- 55

célula cancerosa. En realizaciones preferidas, la célula diana es una célula que expresa CLDN6 que preferiblemente está presente en la superficie celular y/o se presenta con MHC de clase I.

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula tal como un antígeno, es decir, a una parte o fragmento de la molécula que es reconocida por el sistema inmunitario, por ejemplo, que es reconocida por una célula T, en particular cuando se presenta en el contexto de las moléculas MHC. Un epítipo



de una proteína como un antígeno asociado a un tumor comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y está preferiblemente entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más preferiblemente entre 8 y 30, lo más preferiblemente entre 10 y 25 amino ácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede ser preferiblemente de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud. Se prefiere particularmente que el epítipo en el contexto de la presente enseñanza sea un epítipo de células T.

Términos como “epítipo”, “fragmento de antígeno”, “péptido antigénico” o “péptido inmunogénico” se usan indistintamente en este documento y preferiblemente se refieren a una representación incompleta de un antígeno que es preferiblemente capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra el antígeno o una célula expresando o comprendiendo y preferiblemente presentando el antígeno. Preferiblemente, los términos se refieren a una porción inmunogénica de un antígeno. Preferiblemente, es una porción de un antígeno que se reconoce (es decir, se une específicamente) por un receptor de células T, en particular si se presenta en el contexto de las moléculas de MHC. Ciertas porciones inmunogénicas preferidas se unen a una molécula de MHC de clase I o clase II tal como en la superficie de una célula y, por lo tanto, son péptidos de unión a MHC. Como se usa en este documento, se dice que un péptido se “une” a una molécula MHC de clase I o clase II si tal unión es detectable utilizando cualquier ensayo conocido en la técnica.

Preferiblemente, los péptidos divulgados en el presente documento que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 son capaces de estimular una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta celular contra CLDN6 o células caracterizado por la expresión de CLDN6 y preferiblemente caracterizado por la presentación de CLDN6. Preferiblemente, dicho péptido es capaz de estimular una respuesta celular contra una célula caracterizada por la presentación de CLDN6 con MHC de clase I y preferiblemente es capaz de estimular CTL sensible a CLDN6. Preferiblemente, los péptidos de acuerdo con la enseñanza son péptidos presentados de MHC de clase I y/o clase II o pueden procesarse para producir péptidos presentados de MHC de clase I y/o clase II. Preferiblemente, la secuencia unida a la molécula de MHC se selecciona de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5.

Si se presenta un péptido antigénico directamente, es decir, sin procesamiento, en particular sin escisión, tiene una longitud adecuada para unirse a una molécula de MHC, en particular una molécula de MHC de clase I, y preferiblemente es de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 8-11 aminoácidos de longitud, en particular 9 o 10 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, la secuencia de un péptido antigénico que se presenta directamente corresponde sustancialmente y es preferiblemente completamente idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5.

Si se presenta un péptido antigénico después del procesamiento, en particular después de la escisión, el péptido producido por procesamiento tiene una longitud adecuada para unirse a una molécula de MHC, en particular una molécula de MHC de clase I, y preferiblemente es de 7-20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 7-12 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 8-11 aminoácidos de longitud, en particular 9 o 10 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, la secuencia del péptido que se presenta después del procesamiento corresponde sustancialmente y es preferiblemente completamente idéntica a una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5. Por lo tanto, un péptido antigénico de acuerdo con la enseñanza en una realización comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5, y el siguiente procesamiento del péptido antigénico constituye una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5.

Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden sustancialmente a una secuencia de un péptido que se presenta por las moléculas del MHC pueden diferir en uno o más residuos que no son esenciales para el reconocimiento por TCR del péptido presentado por el MHC, o por la unión del péptido al MHC. Dichos péptidos sustancialmente correspondientes preferiblemente también son capaces de estimular una respuesta celular específica de antígeno tal como CTL específica de antígeno. Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren de un péptido presentado en los residuos que no afectan el reconocimiento de TCR pero que mejoran la estabilidad de la unión al MHC pueden mejorar la inmunogenicidad del péptido antigénico, y pueden denominarse en el presente documento “péptidos optimizados”. Al usar el conocimiento existente sobre cuál de estos residuos puede ser más probable que afecte la unión al MHC o al TCR, se puede emplear un enfoque racional para el diseño de péptidos sustancialmente correspondientes. Los péptidos resultantes que son funcionales se contemplan como péptidos antigénicos. Las secuencias como se discutieron anteriormente están abarcadas por el término “variante” utilizado aquí.

“Procesamiento de antígenos” se refiere a la degradación de un antígeno en productos de procesión, que son fragmentos de dicho antígeno (por ejemplo, la degradación de una proteína en péptidos) y la asociación de uno o más de estos fragmentos (por ejemplo, a través de la unión) con moléculas MHC para presentación por células, preferiblemente células presentadoras de antígeno a células T específicas.

Una célula presentadora de antígeno (APC) es una célula que muestra el antígeno en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Las células T pueden reconocer este complejo utilizando su receptor de células T (TCR). Las células presentadoras de antígenos procesan los antígenos y los presentan a las células T.

Las células profesionales presentadoras de antígeno son muy eficientes en la internalización del antígeno, ya sea por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptor, y luego muestran un fragmento del antígeno, unido a una molécula MHC de clase II, en su membrana. La célula T reconoce e interactúa con el complejo de moléculas MHC antígeno-clase II en la membrana de la célula presentadora de antígeno. Luego, la célula presentadora de antígeno produce una señal coestimuladora adicional, lo que lleva a la activación de la célula T. La expresión de moléculas coestimuladoras es una característica definitoria de las células profesionales presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígeno incluyen células presentadoras de antígeno profesionales y células presentadoras de antígeno no profesionales.

Los principales tipos de células presentadoras de antígenos profesionales son las células dendríticas, que tienen el rango más amplio de presentación de antígenos y son probablemente las células presentadoras de antígenos más importantes, macrófagos, células B y ciertas células epiteliales activadas.

Las células presentadoras de antígenos no profesionales no expresan de forma constitutiva las proteínas MHC de clase II necesarias para la interacción con las células T neófitas; estos se expresan solo tras la estimulación de las células presentadoras de antígenos no profesionales por ciertas citoquinas como el IFN $\gamma$ .

Las células dendríticas (DC) son poblaciones de leucocitos que presentan antígenos capturados en tejidos periféricos a células T a través de las vías de presentación de los antígenos MHC de clase II e I. Es bien sabido que las células dendríticas son potentes inductores de respuestas inmunitarias y la activación de estas células es un paso crítico para la inducción de la inmunidad antitumoral.

Las células dendríticas y los progenitores se pueden obtener a partir de sangre periférica, médula ósea, células infiltrantes de tumores, células infiltrantes de tejidos peritumorales, ganglios linfáticos, bazo, piel, sangre del cordón umbilical o cualquier otro tejido o líquido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas pueden diferenciarse ex vivo agregando una combinación de citoquinas como GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o TNF $\alpha$  a cultivos de monocitos extraídos de sangre periférica. Alternativamente, las células CD34 positivas extraídas de sangre periférica, sangre del cordón umbilical o médula ósea pueden diferenciarse en células dendríticas agregando al medio de cultivo combinaciones de GM-CSF, IL-3, TNF $\alpha$ , ligando CD40, LPS, ligando flt3 y/u otro(s) compuesto(s) que induce la diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas se clasifican convenientemente como células "inmaduras" y "maduras", que se pueden utilizar como una forma sencilla de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe interpretarse de manera que excluya todas las posibles etapas intermedias de diferenciación.

Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como células presentadoras de antígenos con una alta capacidad para la captación y el procesamiento de antígenos, lo que se correlaciona con la alta expresión del receptor Fc $\gamma$  y el receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una menor expresión de estos marcadores, pero una alta expresión de las moléculas de la superficie celular responsables de la activación de las células T, como el MHC de clase I y clase II, las moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1 BB).

La maduración de las células dendríticas se conoce como el estado de activación de las células dendríticas en el que dichas células dendríticas presentadoras de antígenos conducen al cebado de las células T, mientras que la presentación de las células dendríticas inmaduras produce tolerancia. La maduración de las células dendríticas está causada principalmente por biomoléculas con características microbianas detectadas por receptores innatos (ADN bacteriano, ARN viral, endotoxinas, etc.), citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-1, IFN), ligadura de CD40 en la superficie de la célula dendrítica por CD40L, y sustancias liberadas de células que sufren una muerte celular estresante. Las células dendríticas pueden derivarse cultivando células de médula ósea in vitro con citoquinas, como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral alfa.

Las células tales como las células presentadoras de antígeno o las células diana se pueden cargar con los péptidos presentados en el MHC de clase I exponiendo, es decir, pulsando, las células con el péptido o transduciendo las células con ácido nucleico, preferiblemente ARN, que codifica un péptido o proteína que comprende el péptido a ser presentado, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica el antígeno.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la enseñanza comprende una célula presentadora de antígeno cargada con péptido antigénico. A este respecto, los protocolos pueden basarse en el cultivo/diferenciación in vitro de células dendríticas manipuladas de tal manera que presenten artificialmente un péptido antigénico. La producción de células dendríticas modificadas genéticamente puede implicar la introducción de ácidos nucleicos que codifican antígenos o péptidos antigénicos en células dendríticas. La transfección de células dendríticas con ARNm es una técnica prometedora de carga de antígenos para estimular una fuerte inmunidad antitumoral. Dicha transfección puede tener lugar ex vivo, y una composición farmacéutica que comprende dichas células transfectadas puede usarse después con fines terapéuticos. Alternativamente, se puede administrar a un paciente un vehículo de administración de genes que se dirige a

una célula dendrítica u otra presentadora de antígeno, lo que da como resultado la transfección que se produce in vivo. La transfección in vivo y ex vivo de células dendríticas, por ejemplo, generalmente se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica, como los descritos en el documento WO 97/24447, o el enfoque de pistola de genes descrito por Mahvi et al., Immunology and cell Biology 75: 456-460, 1997. La carga de antígeno de células dendríticas se puede lograr incubando células dendríticas o células progenitoras con antígeno, ADN (desnudo o dentro de un vector plásmido) o ARN; o con bacterias o virus recombinantes que expresan antígeno (por ejemplo, vectores de vaccinia, viruela aviar, adenovirus o lentivirus).

El término "inmunogenicidad" se refiere a la eficacia relativa de un antígeno para inducir una reacción inmunitaria.

El término "funciones efectoras inmunitarias" en el contexto de la presente enseñanza incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmunitario que resulta, por ejemplo, en la destrucción de células tumorales, o en la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición de tumores. desarrollo, incluida la inhibición de la diseminación del tumor y la metástasis. Preferiblemente, las funciones efectoras inmunitarias en el contexto de la presente enseñanza son funciones efectoras mediadas por células T. Dichas funciones comprenden, en el caso de una célula T auxiliar (célula T CD4+), el reconocimiento de un antígeno o un péptido antigénico derivado de un antígeno en el contexto de moléculas de MHC de clase II por receptores de células T, la liberación de citoquinas y/o la activación de linfocitos CD8+ (CTL) y/o células B, y en el caso de CTL el reconocimiento de un antígeno o un péptido antigénico derivado de un antígeno en el contexto de las moléculas del MHC de clase I por parte de las células T receptores, la eliminación de las células presentadas en el contexto de las moléculas del MHC de clase I, es decir, las células caracterizadas por la presentación de un antígeno con el MHC de clase I, por ejemplo, a través de la apoptosis o la lisis celular mediada por perforina, la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y la destrucción citolítica específica de antígeno que expresan células diana.

El término "célula inmunorreactiva" o "célula efectora inmunitaria" en el contexto de la presente enseñanza se refiere a una célula que ejerce funciones efectoras durante una reacción inmunitaria. Una "célula inmunorreactiva" es preferiblemente capaz de unirse a un antígeno tal como un antígeno expresado en la superficie de una célula o una célula caracterizada por la presentación de un antígeno o un péptido antigénico derivado de un antígeno y mediando una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, tales células secretan citocinas y/o quimioquinas, matan microbios, secretan anticuerpos, reconocen células infectadas o cancerosas y, opcionalmente, eliminan dichas células. Por ejemplo, las células inmunorreactivas comprenden células T (células T citotóxicas, células T auxiliares, células T infiltrantes de tumores), células B, linfocitos citotóxicos naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Preferiblemente, en el contexto de la presente enseñanza, "células inmunorreactivas" son células T, preferiblemente células T CD4+ y/o CD8+.

Preferiblemente, una "célula inmunorreactiva" reconoce un antígeno o un péptido antigénico derivado de un antígeno con un cierto grado de especificidad, en particular si se presenta en el contexto de moléculas MHC tales como en la superficie de células presentadoras de antígeno o células enfermas tales como células cancerosas. Preferiblemente, dicho reconocimiento permite que la célula que reconoce un antígeno o un péptido antigénico derivado de dicho antígeno sea sensible o reactiva. Si la célula es una célula T auxiliar (célula T CD4+) que tiene receptores que reconocen un antígeno o un péptido antigénico derivado de un antígeno en el contexto de las moléculas del MHC de clase II, tal capacidad de respuesta o reactividad puede implicar la liberación de citoquinas y/o la activación de linfocitos CD8+ (CTL) y/o células B. Si la célula es una CTL, tal respuesta o reactividad puede implicar la eliminación de las células presentadas en el contexto de las moléculas MHC de clase I, es decir, las células caracterizadas por la presentación de un antígeno con el MHC de clase I, por ejemplo, a través de la apoptosis o lisis de células mediadas por perforina. De acuerdo con la enseñanza, la capacidad de respuesta de CTL puede incluir flujo de calcio sostenido, división celular, producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , regulación al alza de marcadores de activación como CD44 y CD69, y la muerte citolítica específica de células diana que expresan antígeno. La capacidad de respuesta de CTL también se puede determinar utilizando un indicador artificial que indique con precisión la capacidad de respuesta de CTL. Dichos CTL que reconocen un antígeno o un péptido antigénico derivado de un antígeno y son reactivos o reactivos también se denominan "CTL sensibles a antígenos" en este documento. Si la célula es una célula B, tal respuesta puede implicar la liberación de inmunoglobulinas.

De acuerdo con la enseñanza, el término "célula inmunorreactiva" también incluye una célula que puede madurar y convertirse en una célula inmunitaria (tal como una célula T, en particular una célula T auxiliar o una célula T citolítica) con la estimulación adecuada. Las células inmunorreactivas comprenden células madre hematopoyéticas CD34+, células T inmaduras y maduras y células B inmaduras y maduras. Si se desea la producción de células citolíticas o células T auxiliares que reconocen un antígeno, la célula inmunoreactiva se pone en contacto con una célula que presenta un antígeno o péptido antigénico en condiciones que favorecen la producción, diferenciación y/o selección de células T citolíticas y de células T auxiliares. La diferenciación de los precursores de células T en una célula T citolítica, cuando se expone a un antígeno, es similar a la selección clonal del sistema inmunitario.

Una “célula linfoide” es una célula que, opcionalmente después de una modificación adecuada, por ejemplo, después de la transferencia de un receptor de células T, es capaz de producir una respuesta inmunitaria tal como una respuesta inmunitaria celular, o una célula precursora de dicha célula, e incluye linfocitos, preferiblemente linfocitos T, linfoblastos y células plasmáticas. Una célula linfoide puede ser una célula

5 inmunorreactiva como se describe en el presente documento. Una célula linfoide preferida es una célula T que carece de expresión endógena de un receptor de células T y que puede modificarse para expresar dicho receptor de células T en la superficie celular.

Los términos “célula T” y “linfocito T” se usan indistintamente en este documento e incluyen células T auxiliares (células T CD4+) y células T citotóxicas (CTL, células T CD8+) que comprenden células T citolíticas.

10 Las células T pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos y desempeñan una función central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, como las células B y los linfocitos citotóxicos naturales por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado receptores de células T (TCR). El timo es el principal órgano responsable de la maduración de las células T de las células T. Se han descubierto varios subconjuntos diferentes de células T, cada uno con una función distinta.

15 Las células T auxiliares ayudan a otros glóbulos blancos en procesos inmunológicos, incluida la maduración de células B en células plasmáticas y la activación de células T citotóxicas y macrófagos, entre otras funciones. Estas células también se conocen como células T CD4+ porque expresan la proteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos por moléculas MHC de clase II que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Una vez activados, se

20 dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citoquinas que regulan o ayudan en la respuesta inmunitaria activa.

Las células T citotóxicas destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo del trasplante. Estas células también se conocen como células T CD8+ ya que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC de clase I, que está presente en la superficie de casi todas las células del cuerpo.

25

La mayoría de las células T tienen un receptor de células T (TCR) que existe como un complejo de varias proteínas. El receptor real de células T está compuesto por dos cadenas peptídicas separadas, que se producen a partir de los genes alfa y beta ( $TCR\alpha$  y  $TCR\beta$ ) independientes del receptor de células T y se denominan cadenas TCR  $\alpha$  y  $\beta$ . Las células T  $\gamma\delta$  (células T delta gamma) representan un pequeño subconjunto

30 de células T que poseen un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie. Sin embargo, en las células T  $\gamma\delta$ , el TCR está formado por una cadena  $\gamma$  y una cadena  $\delta$ . Este grupo de células T es mucho menos común (2% del total de células T) que las células T  $\alpha\beta$ .

La estructura del receptor de células T es muy similar a los fragmentos Fab de inmunoglobulina, que son regiones definidas como la cadena ligera y pesada combinada de un brazo de anticuerpo. Cada cadena del

35 TCR es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y posee un dominio variable (V) de inmunoglobulina (Ig) de terminal N, un dominio constante (C) de Ig, una región de membrana transmembrana/celular y una corta cola citoplásmica en el extremo de terminal C.

De acuerdo con la enseñanza, el término “región variable de un receptor de células T” se refiere a los dominios variables de las cadenas TCR.

40 La región variable tanto de la cadena  $\alpha$  como de la cadena  $\beta$  de TCR tiene tres regiones determinantes de hipervariabilidad o complementariedad (CDR), mientras que la región variable de la cadena  $\beta$  tiene un área adicional de hipervariabilidad (HV4) que normalmente no entra en contacto con el antígeno y por lo tanto no se considera un CDR. CDR3 es la principal CDR responsable del reconocimiento del antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que CDR1 de la cadena  $\alpha$  interactúa con la parte de terminal N del péptido

45 antigénico, mientras que la CDR1 de la cadena  $\beta$  interactúa con la parte de terminal C de El péptido. Se cree que CDR2 reconoce el MHC. No se cree que la CDR4 de la cadena  $\beta$  participe en el reconocimiento de antígenos, pero se ha demostrado que interactúa con superantígenos.

De acuerdo con la enseñanza, el término “al menos una de las secuencias de CDR” significa preferiblemente al menos la secuencia de CDR3. El término “secuencias CDR de una cadena receptora de células T” se refiere

50 preferiblemente a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena  $\alpha$  o de la cadena  $\beta$  de un receptor de células T.

El dominio constante del dominio TCR consiste en secuencias de conexión cortas en las que un residuo de cisteína forma enlaces disulfuro, que forman un enlace entre las dos cadenas.

Todas las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos derivados de células madre hematopoyéticas pueblan el timo y se expanden por división

55 celular para generar una gran población de timocitos inmaduros. Los primeros timocitos no expresan ni CD4 ni CD8 y, por lo tanto, se clasifican como células doble negativas (CD4-CD8-). A medida que progresan a lo largo

de su desarrollo, se convierten en timocitos doble positivos (CD4+CD8+) y finalmente maduran a timocitos individuales positivos (CD4+CD8 - o CD4-CD8+) que luego se liberan desde el timo a los tejidos periféricos.

La primera señal en la activación de las células T se proporciona mediante la unión del receptor de células T a un péptido corto presentado por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en otra célula. Esto asegura que solo se active una célula T con un TCR específico para ese péptido. La célula asociada suele ser una célula presentadora de antígeno profesional (APC), generalmente una célula dendrítica en el caso de respuestas neófitas, aunque las células B y los macrófagos pueden ser importantes APC. Los péptidos presentados a las células T CD8+ por las moléculas MHC de clase I tienen una longitud de 8-10 aminoácidos; Los péptidos presentados a las células T CD4+ por las moléculas de MHC de clase II son más largos, ya que los extremos de la hendidura de unión de la molécula de MHC de clase II están abiertos.

Las células T pueden prepararse generalmente in vitro o ex vivo, usando procedimientos estándar. Por ejemplo, las células T pueden estar presentes dentro (o aisladas de) la médula ósea, la sangre periférica o una fracción de la médula ósea o la sangre periférica de un mamífero, como un paciente, utilizando un sistema de separación de células disponible comercialmente. Alternativamente, las células T pueden derivarse de seres humanos relacionados, no relacionados, animales no humanos, estirpes celulares o cultivos. Una "muestra que comprende células T" puede ser, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Las células T pueden estimularse con células presentadoras de antígeno, péptido, ácido nucleico y/o antígeno (APC) que expresan un antígeno. Dicha estimulación se realiza en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la generación de células T que son específicas para un antígeno, un péptido y/o células que presentan un antígeno o un péptido.

La activación específica de las células T CD4+ o CD8+ puede detectarse de varias maneras. Los métodos para detectar la activación de células T específicas incluyen detectar la proliferación de células T, la producción de citoquinas (por ejemplo, linfocinas) o la generación de actividad citolítica. Para las células T CD4+, un método preferido para detectar la activación de células T específicas es la detección de la proliferación de células T. Para las células T CD8+, un método preferido para detectar la activación de células T específicas es la detección de la generación de actividad citolítica.

Para generar estirpes de células T CD8+, las células presentadoras de antígeno, preferiblemente las células presentadoras de antígeno autólogas, transfectadas con un ácido nucleico que produce el antígeno pueden usarse como células estimuladoras.

Los ácidos nucleicos, como el ARN que codifica las cadenas del receptor de células T (TCR), pueden introducirse en células linfoides como las células T u otras células con potencial lítico. En una realización adecuada, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR se clonan a partir de una línea de células T específica de antígeno y se utilizan para la terapia de células T adoptiva. A este respecto, la presente enseñanza proporciona receptores de células T específicos para los péptidos CLDN6 o CLDN6 divulgados en este documento. En general, este aspecto de la enseñanza se refiere a receptores de células T que reconocen o se unen a los péptidos CLDN6 presentados en el contexto de MHC. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un receptor de células T, por ejemplo, un receptor de células T proporcionado de acuerdo con la presente enseñanza, puede estar contenido en moléculas de ácido nucleico separadas tales como vectores de expresión o, alternativamente, en una única molécula de ácido nucleico. De acuerdo con lo anterior, el término "un ácido nucleico que codifica un receptor de células T" o términos similares se refieren a moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas de receptores de células T en la misma o preferiblemente en diferentes moléculas de ácido nucleico.

El término "reactivo de células inmunorreactivas con un péptido" se refiere a una célula inmunorreactiva que cuando reconoce el péptido, en particular si se presenta en el contexto de moléculas de MHC como las de células presentadoras de antígenos o células enfermas como las células cancerosas, ejerce Funciones efectoras de las células inmunorreactivas como se describió anteriormente.

El término "receptor de células T reactivo con un péptido" se relaciona con un receptor de células T que, cuando está presente en una célula inmunorreactiva, reconoce el péptido, en particular si se presenta en el contexto de moléculas MHC, como en la superficie de células presentadoras de antígenos o células enfermas tales como células cancerosas, de manera que la célula inmunorreactiva ejerce funciones efectoras de células inmunorreactivas como se describió anteriormente.

El término "célula T reactiva al antígeno" o términos similares se refieren a una célula T que reconoce un antígeno si se presenta en el contexto de moléculas MHC, como en la superficie de células presentadoras de antígeno o células enfermas como las células cancerosas y ejerce funciones efectoras de Las células T como se describió anteriormente.

El término "célula linfóide específica de antígeno" se relaciona con una célula linfóide que, en particular cuando se le proporciona un receptor de célula T específico de antígeno, reconoce el antígeno si se presenta en el contexto de moléculas MHC como en la superficie de las células presentadoras de antígeno o las células

enfermas, como las células cancerosas, y preferiblemente ejerce funciones efectoras de las células T como se describió anteriormente. Las células T y otras células linfoides se consideran específicas para el antígeno si las células destruyen las células diana que expresan un antígeno y/o presentan un péptido antigénico. La especificidad de las células T puede evaluarse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas estándar, por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o un ensayo de proliferación. Alternativamente, se puede medir la síntesis de linfocinas (como el interferón- $\gamma$ ).

El término "complejo de histocompatibilidad principal" y la abreviatura "MHC" incluyen las moléculas MHC de clase I y MHC de clase II y se relacionan con un complejo de genes que se encuentra en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas MHC son importantes para la señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígenos o células enfermas en las reacciones inmunitarias, en donde las proteínas o moléculas MHC se unen a los péptidos y las presentan para su reconocimiento por los receptores de las células T. Las proteínas codificadas por el MHC se expresan en la superficie de las células y muestran tanto antígenos propios (fragmentos peptídicos de la propia célula) como antígenos no propios (por ejemplo, fragmentos de microorganismos invasores) a una célula T.

La región MHC se divide en tres subgrupos, clase I, clase II y clase III. Las proteínas MHC de clase I contienen una cadena  $\alpha$  y una microglobulina  $\beta_2$  (que no forman parte del MI-IC codificado por el cromosoma 15). Presentan fragmentos de antígeno a las células T citotóxicas. En la mayoría de las células del sistema inmunitario, específicamente en las células presentadoras de antígenos, las proteínas MHC de clase II contienen cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y presentan fragmentos de antígenos a las células T auxiliares. La región MHC de clase III codifica para otros componentes inmunitarios, como los componentes del complemento y algunos que codifican las citoquinas.

En los seres humanos, los genes en la región MHC que codifican las proteínas presentadoras de antígenos en la superficie celular se denominan genes de antígeno leucocitario humano (HLA). Sin embargo, la abreviatura MHC se usa a menudo para referirse a los productos del gen HLA. Los genes HLA incluyen los nueve genes llamados MHC clásicos: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA y HLA-DRB1.

En una realización preferida de todos los aspectos de la enseñanza, una molécula de MHC es una molécula HLA.

Por "célula caracterizada por la presentación de un antígeno", "célula que presenta un antígeno", "antígeno presentado por una célula", "antígeno presentado" o expresiones similares se refiere a una célula como una célula enferma como una célula cancerosa o una célula cancerosa, o una célula presentadora de antígeno que presenta el antígeno que expresa o un fragmento derivado de dicho antígeno, por ejemplo, mediante el procesamiento del antígeno, en el contexto de las moléculas MHC, en particular las moléculas MHC de clase I. De manera similar, los términos "enfermedad caracterizada por la presentación de un antígeno" denota una enfermedad que involucra células caracterizadas por la presentación de un antígeno, en particular con el MHC de clase I. La presentación de un antígeno por una célula puede efectuarse transfectando la célula con un ácido nucleico tal como el ARN que codifica el antígeno.

Por "fragmento de un antígeno que se presenta" o expresiones similares se entiende que el fragmento puede presentarse por MHC de clase I o clase II, preferiblemente MHC de clase I, por ejemplo. Cuando se agrega directamente a las células presentadoras de antígeno. En una realización, el fragmento es un fragmento que se presenta naturalmente por las células que expresan un antígeno.

Algunos métodos terapéuticos se basan en una reacción del sistema inmunitario de un paciente, que resulta en una lisis de células enfermas que presentan un antígeno con MHC de clase I. A este respecto, por ejemplo, pueden administrarse linfocitos T citotóxicos autólogos específicos para un complejo de un péptido antigénico y una molécula de MHC a un paciente que tiene una enfermedad. La producción de dichos linfocitos T citotóxicos in vitro es conocida. Un ejemplo de un método para diferenciar las células T se puede encontrar en el documento WO-A-9633265. En general, una muestra que contiene células, como las células sanguíneas, se toma del paciente y las células se ponen en contacto con una célula que presenta el complejo y que puede causar la propagación de linfocitos T citotóxicos (por ejemplo, células dendríticas). La célula diana puede ser una célula transflectada tal como una célula COS. Estas células transflectadas presentan el complejo deseado en su superficie y, cuando se ponen en contacto con linfocitos T citotóxicos, estimulan la propagación de estos últimos. Los linfocitos T citotóxicos autólogos expandidos clonalmente se administran al paciente.

En otro método de selección de linfocitos T citotóxicos, se utilizan tetrámeros fluorogénicos de complejos de molécula/péptido MHC de clase I para obtener clones específicos de linfocitos T citotóxicos (Altman et al. (1996), Science 274: 94-96; Dunbar et al. (1998), Curr. Biol. 8:413-416, 1998).

Además, las células que presentan el complejo deseado (por ejemplo, células dendríticas) pueden combinarse con linfocitos T citotóxicos de individuos sanos u otras especies (por ejemplo, un ratón) que pueden dar lugar a la propagación de linfocitos T citotóxicos específicos con alta afinidad. El receptor de células T de alta afinidad

de estos linfocitos T específicos propagados puede clonarse y, opcionalmente, humanizarse en un grado diferente, y los receptores de células T así obtenidos se pueden transducir a través de transferencia génica, por ejemplo, utilizando vectores retrovirales, en células T de pacientes. La transferencia adoptiva puede llevarse a cabo utilizando estos linfocitos T alterados genéticamente (Stanislawski et al. (2001), Nat Immunol. 2:962-70; Kessels et al. (2001), Nat Immunol. 2:957-61).

Los linfocitos T citotóxicos también pueden generarse in vivo de una manera conocida per se. Un método utiliza células no proliferativas que expresan un complejo MHC de clase I/péptido. Las células utilizadas aquí serán aquellas que expresan habitualmente el complejo, como las células tumorales irradiadas o las células transfectadas con uno o ambos genes necesarios para la presentación del complejo (es decir, el péptido antigénico y la molécula que presenta MHC). Otra forma preferida es la introducción de un antígeno en forma de ARN recombinante que puede introducirse en las células por transferencia liposómica o por electroporación, por ejemplo. Las células resultantes presentan el complejo de interés y son reconocidas por linfocitos T citotóxicos autólogos que luego se propagan.

Se puede lograr un efecto similar combinando un antígeno o un péptido antigénico con un adyuvante para hacer posible la incorporación en células presentadoras de antígeno in vivo. El antígeno o antígeno péptido puede representarse como proteína, como ADN (por ejemplo, dentro de un vector) o como ARN. El antígeno puede procesarse para producir un compañero peptídico para la molécula de MHC, mientras que un fragmento del mismo puede presentarse sin la necesidad de un procesamiento adicional. Este último es el caso en particular, si estos pueden unirse a las moléculas MHC. Se da preferencia a formas de administración en las que el antígeno completo es procesado in vivo por una célula dendrítica, ya que esto también puede producir respuestas de células T auxiliares que son necesarias para una respuesta inmunitaria efectiva (Ossendorp et al., Immunol Lett. (2000), 74: 75-9; Ossendorp et al. (1998), J. Exp. Medicina. 187:693-702). En general, es posible administrar una cantidad eficaz del antígeno asociado a tumor a un paciente mediante inyección intradérmica, por ejemplo. Sin embargo, la inyección también puede llevarse a cabo intranodalmente en un ganglio linfático (Maloy et al. (2001), Proc Natl Acad Sci USA 98: 3299-303).

De acuerdo con la enseñanza, el término "receptor artificial de células T" es sinónimo de los términos "receptor quimérico de células T" y "receptor de antígeno quimérico (CAR)".

Estos términos se refieren a receptores diseñados por ingeniería genética, que confieren una especificidad arbitraria, como la especificidad de un anticuerpo monoclonal sobre una célula efectora inmune, como una célula T. De esta manera, se puede generar un gran número de células T específicas del cáncer para la transferencia de células adoptiva. Por lo tanto, un receptor artificial de células T puede estar presente en las células T, por ejemplo, en lugar de o además del propio receptor de células T de las células T. Dichas células T no requieren necesariamente el procesamiento y la presentación de un antígeno para el reconocimiento de la célula diana, sino que pueden reconocer preferentemente con especificidad cualquier antígeno presente en una célula diana. Preferiblemente, dicho receptor artificial de células T se expresa en la superficie de las células. Para el propósito de la presente enseñanza, las células T que comprenden un receptor artificial de células T están comprendidas por el término "célula T" como se usa en el presente documento.

En una realización, un fragmento variable de una sola cadena (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal se fusiona con la transmembrana CD3-zeta y el endodominio. Dichas moléculas dan como resultado la transmisión de una señal zeta en respuesta al reconocimiento por el scFv de su objetivo de antígeno en una célula objetivo y la destrucción de la célula objetivo que expresa el antígeno objetivo. Los dominios de reconocimiento de antígenos que también se pueden usar incluyen, entre otros, cadenas alfa y beta de receptor de células T (TCR). De hecho, casi cualquier cosa que se una a un objetivo dado con alta afinidad puede usarse como un dominio de reconocimiento de antígeno.

Tras el reconocimiento de antígenos, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula. A este respecto, un "dominio de señalización de células T" es un dominio, preferiblemente un endodominio, que transmite una señal de activación a la célula T después de que el antígeno está unido. El componente de endodominio más utilizado es CD3-zeta.

La terapia de transferencia de células adoptiva con células T diseñadas por CAR que expresan receptores de antígeno quiméricos es un agente terapéutico anticancerígeno prometedor, ya que las células T modificadas por CAR pueden diseñarse para atacar prácticamente cualquier antígeno tumoral. Por ejemplo, las células T del paciente pueden ser modificadas por ingeniería genética para expresar CAR específicamente dirigidas hacia los antígenos en las células tumorales del paciente, y luego infundirse nuevamente en el paciente.

De acuerdo con la enseñanza, un receptor artificial de células T puede reemplazar la función de un receptor de células T como se describió anteriormente y, en particular, puede conferir reactividad tal como actividad citolítica a una célula tal como una célula T como se describió anteriormente. Sin embargo, a diferencia de la unión del receptor de células T a un complejo péptido-antígeno MHC como se describió anteriormente, un receptor artificial de células T puede unirse a un antígeno, en particular expresado en la superficie celular.

La cadena CD3-zeta de glicoproteína de superficie de células T es una proteína que en los humanos está codificada por el gen CD247. La CD3-zeta junto con los heterodímeros alfa/beta y gamma/delta del receptor de células T y CD3-gamma, -delta y -epsilon, forman el complejo CD3 del receptor de células T. La cadena zeta desempeña una función importante en el acoplamiento del reconocimiento de antígenos a varias vías de transducción de señales intracelulares. El término "CD3-zeta" se refiere preferiblemente a CD3-zeta humana y, en particular, a una proteína que comprende, que consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 de la lista de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

CD28 (Grupo de diferenciación 28) es una de las moléculas expresadas en las células T que proporcionan señales coestimuladoras, que son necesarias para la activación de las células T. CD28 es el receptor para CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). La estimulación a través de CD28 además del receptor de células T (TCR) puede proporcionar una potente señal coestimuladora a las células T para la producción de diversas interleucinas (en particular, IL-6). El término "CD28" se refiere preferiblemente a CD28 humano, y, en particular, a una proteína que comprende, que consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 de la lista de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

De acuerdo con la enseñanza, los CAR pueden comprender generalmente tres dominios.

El primer dominio es el dominio de unión que reconoce y une CLDN6.

El segundo dominio es el dominio de coestimulación. El dominio de coestimulación sirve para mejorar la proliferación y la supervivencia de los linfocitos citotóxicos tras la unión de la CAR a una fracción dirigida. La identidad del dominio de coestimulación está limitada solo porque tiene la capacidad de mejorar la proliferación celular y la supervivencia tras la unión de la fracción seleccionado por el CAR. Los dominios de coestimulación adecuados incluyen CD28, CD137 (4-1 BB), un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), CD134 (OX40), un miembro de la superfamilia de receptores TNFR, y CD278 (ICOS), una molécula coestimuladora de la superfamilia CD28 expresada en células T activadas. El experto en la materia entenderá que las variantes de secuencia de estos dominios de coestimulación observados pueden usarse sin impactar adversamente en la enseñanza, donde las variantes tienen la misma actividad o una actividad similar a la del dominio en el que se modelan. Tales variantes tendrán al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que se derivan. En algunas realizaciones de la enseñanza, las construcciones de CAR comprenden dos dominios de coestimulación. Si bien las combinaciones particulares incluyen todas las variaciones posibles de los cuatro dominios señalados, los ejemplos específicos incluyen CD28+CD137 (4-1 BB) y CD28+CD134 (OX40).

El tercer dominio es el dominio de señalización de activación (o dominio de señalización de células T). El dominio de señalización de activación sirve para activar los linfocitos citotóxicos tras la unión del CAR a CLDN6. La identidad del dominio de señalización de activación está limitada solo porque tiene la capacidad de inducir la activación de los linfocitos citotóxicos seleccionados tras la unión del CLDN6 por parte de la CAR. Los dominios de señalización de activación adecuados incluyen la cadena CD3[zeta] de células T y el receptor Fc [gamma]. El experto en la materia entenderá que pueden usarse variantes de secuencia de estos dominios de señalización de activación observados sin impactar adversamente en la enseñanza, donde las variantes tienen la misma actividad o actividad similar a la del dominio en el que se modelan. Tales variantes tendrán al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio del que se derivan.

Los CAR de la presente enseñanza pueden comprender los tres dominios, juntos en forma de una proteína de fusión. Dichas proteínas de fusión generalmente comprenderán un dominio de unión, uno o más dominios de coestimulación, y un dominio de señalización de activación, enlazados en una dirección de terminal N a terminal C. Sin embargo, los CAR de la presente enseñanza no están limitados a esta disposición y otras disposiciones son aceptables e incluyen un dominio de unión, un dominio de señalización de activación y uno o más dominios de coestimulación. Se entenderá que debido a que el dominio de unión debe estar libre para unirse a CLDN6, la colocación del dominio de unión en la proteína de fusión será generalmente tal que se logre la visualización de la región en el exterior de la célula. De la misma manera, debido a que los dominios de señalización de estimulación y activación sirven para inducir la actividad y la proliferación de los linfocitos citotóxicos, la proteína de fusión generalmente mostrará estos dos dominios en el interior de la célula. Los CAR pueden incluir elementos adicionales, como un péptido señal para asegurar una exportación adecuada de la proteína de fusión a la superficie de las células, un dominio transmembrana para garantizar que la proteína de fusión se mantenga como una proteína de membrana integral y un dominio de bisagra (o región separadora) que imparte flexibilidad al dominio de unión y permite una unión fuerte a CLDN6.

Las células utilizadas en relación con el sistema CAR de la presente enseñanza son preferiblemente células T, en particular linfocitos citotóxicos, preferiblemente seleccionadas de células T citotóxicas, linfocitos citotóxicos naturales (NK) y linfocitos citotóxicos activados por linfocinas (LAK). Tras la activación, cada uno de estos linfocitos citotóxicos desencadena la destrucción de las células diana. Por ejemplo, las células T citotóxicas desencadenan la destrucción de las células diana por uno o ambos de los siguientes medios. Primero, tras la activación, las células T liberan citotoxinas tales como perforina, granzimas y granulicina. La perforina y la



granulisina crean poros en la célula diana, y las granzimas entran a la célula y desencadenan una cascada de caspasas en el citoplasma que induce la apoptosis (muerte celular programada) de la célula. En segundo lugar, la apoptosis se puede inducir a través de la interacción del ligando Fas-Fas entre las células T y las células tumorales diana. Los linfocitos citotóxicos serán preferiblemente células autólogas, aunque se pueden usar células heterólogas o células alogénicas.

De acuerdo con la enseñanza, se puede usar una "referencia" tal como una muestra de referencia o un organismo de referencia para correlacionar y comparar los resultados obtenidos en los métodos de la enseñanza de una muestra de prueba o un organismo de prueba. Normalmente, el organismo de referencia es un organismo sano, en particular un organismo que no padece una enfermedad como la enfermedad del cáncer. Un "valor de referencia" o "nivel de referencia" se puede determinar a partir de una referencia empíricamente midiendo un número suficientemente grande de referencias. Preferiblemente, el valor de referencia se determina midiendo al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 5, preferiblemente al menos 8, preferiblemente al menos 12, preferiblemente al menos 20, preferiblemente al menos 30, preferiblemente al menos 50, o preferiblemente al menos 100 referencias.

De acuerdo con la enseñanza, el término "agente de unión" incluye cualquier compuesto que tenga una capacidad de unión a un objetivo. Preferiblemente, dicho agente de unión comprende al menos un dominio de unión para el objetivo. El término incluye moléculas tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, receptores de antígenos quiméricos (CAR) y todas las moléculas de unión artificial (andamios) que tienen una capacidad de unión al objetivo, incluidos, entre otros, nanocuerpos, afficuerpos, anticalinas, DARPs, monocuerpos, avímeros y microcuerpos. En una realización, dicha unión es una unión específica.

El término "inmunoglobulina" se refiere a proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas, preferiblemente a receptores de antígeno como los anticuerpos o el receptor de células B (BCR). Las inmunoglobulinas se caracterizan por un dominio estructural, es decir, el dominio de inmunoglobulina, que tiene un pliegue de inmunoglobulina (Ig) característico. El término abarca inmunoglobulinas unidas a membrana, así como inmunoglobulinas solubles. Las inmunoglobulinas unidas a membrana también se denominan inmunoglobulinas de superficie o inmunoglobulinas de membrana, que generalmente forman parte de la BCR. Las inmunoglobulinas solubles se denominan anticuerpos. Las inmunoglobulinas generalmente comprenden varias cadenas, típicamente dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Estas cadenas están compuestas principalmente por dominios de inmunoglobulina, como el dominio  $V_L$  (cadena ligera variable), el dominio  $C_L$  (cadena ligera constante) y los dominios  $C_H$  (cadena pesada constante)  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y  $C_{H4}$ . Hay cinco tipos de cadenas pesadas de inmunoglobulina de mamíferos, es decir,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$  que representan las diferentes clases de anticuerpos, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A diferencia de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas solubles, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de membrana o superficie comprenden un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico corto en su terminal carboxi. En los mamíferos hay dos tipos de cadenas ligeras, es decir,  $\lambda$  y  $\kappa$ . Las cadenas de inmunoglobulina comprenden una región variable y una región constante. La región constante se conserva esencialmente dentro de los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas, en donde la parte variable es altamente diversa y representa el reconocimiento de antígenos.

El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad y afinidad de unión. En una realización, los anticuerpos monoclonales se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado con una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo recombinante", como se usa en este documento, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un

hibridoma preparado a partir de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante y (d) anticuerpos preparados, expresado, creado o aislado por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en el que la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión al antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificadas para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otra. Normalmente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas usando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de ser fácil de preparar y la especificidad no se ve afectada por la fuente, la región constante es humana, es menos probable que provoque una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo en particular.

Los anticuerpos pueden derivar de diferentes especies, incluyendo, entre otros, ratones, ratas, conejos, cobayas y humanos.

Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen IgA tal como IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, y anticuerpos IgD. En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo IgG1, kappa o IgG1, lambda (es decir, IgG1,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticuerpo IgG2a (por ejemplo, IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo, IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo, IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo, IgG4,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ).

Los anticuerpos descritos en el presente documento están preferiblemente aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en este documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLDN6 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CLDN6). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CLDN6 humano puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de CLDN6). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos. En una realización de la enseñanza, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a anticuerpos que tienen diferentes especificidades y se combinan en una composición o mezcla bien definida.

Los términos "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de unión") o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") o términos similares se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones

determinantes de complementariedad aisladas (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un ligador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una cadena de proteína única en la que el par regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena única también deben incluirse dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región de bisagra y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se divulgan adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

De acuerdo con la enseñanza, el término "dominio de unión para CLDN6" incluye y preferiblemente se relaciona con la porción de unión a antígeno de un anticuerpo CLDN6, es decir, un anticuerpo que está dirigido contra CLDN6 y es preferiblemente específico para CLDN6.

El término "dominio de unión" caracteriza en relación con la presente enseñanza una estructura, por ejemplo, de un anticuerpo, que se une a/interactúa con una estructura/antígeno/epitopo diana dados. Por lo tanto, el dominio de unión de acuerdo con la enseñanza designa un "sitio de interacción de antígeno".

Todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos tales como fragmentos de anticuerpos como se describe en el presente documento para los fines de la enseñanza están abarcados por el término "anticuerpo".

Los anticuerpos pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluida la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación de fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Otros sistemas animales preferidos para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y conejo (por ejemplo, descrito en Spieker-Polet et al., Proc. Natl Acad Sci. 92: 9348 (1995), véase también Rossi et al., Enm. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

Para generar anticuerpos, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con el portador derivados de la secuencia del antígeno, es decir, la secuencia contra la que se dirigen los anticuerpos, una preparación enriquecida de antígeno expresado de forma recombinante o fragmentos del mismo y/o células que expresan el antígeno, como se describió. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica el antígeno o fragmentos del mismo. En el caso de que las inmunizaciones que utilizan una preparación purificada o enriquecida del antígeno no produzcan anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan el antígeno, por ejemplo, una estirpe celular, para promover respuestas inmunitarias.

La respuesta inmunitaria se puede monitorear durante el transcurso del protocolo de inmunización, obteniéndose muestras de plasma y suero por vía venosa de la cola o por sangrados retroorbitales. Los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse por vía intraperitoneal o intravenosa con células que expresan antígeno 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas específicos que secretan anticuerpos.

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, se pueden aislar esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarlos a una estirpe celular inmortalizada apropiada, como una estirpe celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden seleccionarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales se pueden analizar mediante ELISA para detectar hibridomas secretores de anticuerpos. Por análisis de inmunofluorescencia y FACS utilizando células que expresan antígeno, pueden identificarse anticuerpos con especificidad para el antígeno. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden ser replacionados, cribados nuevamente, y si todavía son positivos para

anticuerpos monoclonales pueden ser subclonados por dilución limitante. Los subclones estables pueden entonces cultivarse in vitro para generar anticuerpos en el medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

La capacidad de los anticuerpos y otros agentes de unión para unirse a un antígeno se puede determinar mediante ensayos de unión estándar (por ejemplo, ELISA, Western Blot, inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

Los anticuerpos y derivados de anticuerpos son útiles para proporcionar dominios de unión tales como fragmentos de anticuerpos, en particular para proporcionar regiones VL y VH.

Un dominio de unión para CLDN6 que puede estar presente dentro de un receptor artificial de células T tiene la capacidad de unirse a CLDN6, es decir, la capacidad de unirse a un epítipo presente en CLDN6, preferiblemente un epítipo ubicado dentro de los dominios extracelulares de CLDN6, en particular el primero bucle extracelular, preferiblemente posiciones de aminoácidos 28 a 76 de CLDN6 o el segundo bucle extracelular, preferiblemente posiciones de aminoácidos 141 a 159 de CLDN6. En realizaciones particulares, un dominio de unión para CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en CLDN9. Preferiblemente, un dominio de unión para CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en CLDN4 y/o CLDN3. Más preferiblemente, un dominio de unión para CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en una proteína CLDN distinta de CLDN6.

Un dominio de unión para CLDN6 se une preferiblemente a CLDN6, pero no a CLDN9 y preferiblemente no se une a CLDN4 y/o CLDN3. Preferiblemente, un dominio de unión para CLDN6 es específico para CLDN6. Preferiblemente, un dominio de unión para CLDN6 se une a CLDN6 expresado en la superficie celular. En realizaciones preferidas particulares, un dominio de unión para CLDN6 se une a epítopos nativos de CLDN6 presentes en la superficie de células vivas.

En una realización preferida, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, 32, 34 y 36 o un fragmento de las mismas, o una variante de dicha secuencia o fragmento de aminoácidos.

En una realización preferida, un dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 38 y 39 o un fragmento de la misma, o una variante de dicha secuencia o fragmento de aminoácidos.

En ciertas realizaciones preferidas, un dominio de unión para CLDN6 comprende una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) seleccionada entre las siguientes posibilidades (i) a (xi):

(i) el VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30 o un fragmento de la misma y el VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31 o un fragmento de la misma,

(ii) el VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33 o un fragmento de la misma,

(iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 35 o un fragmento de la misma,

(iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 36 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 37 o un fragmento de la misma,

(v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31 o un fragmento de la misma,

(vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38 o un fragmento de la misma,

(vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39 o un fragmento de la misma,

En una realización particularmente preferida, un dominio de unión para CLDN6 comprende la siguiente combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL):

la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma y el VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39 o un fragmento de la misma.

El término "fragmento" se refiere, en particular, a una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable de CDR3, de la región variable de la cadena pesada (VH) y/o de la región variable de la cadena ligera (VL). En una realización, dicho uno o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3. En una realización particularmente preferida, el término "fragmento" se refiere a las regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH) y/o de la región variable de la cadena ligera (VL).

En una realización, un dominio de unión para CLDN6 que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en el presente documento comprende dichas CDR junto con sus regiones marco de intervención. Preferiblemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente el 50% de una o ambas de las regiones marco primera y cuarta, el 50% es el 50% del terminal C de la primera región marco y el 50% de terminal N de la cuarta región marco. La construcción de dominios de unión hechos por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos de terminal N o de terminal C a las regiones variables codificadas por enlaces introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, incluida la introducción de enlaces para unir regiones variables de la enseñanza. para otras secuencias de proteínas que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas.

En una realización, un dominio de unión que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en este documento comprende dichas CDR en un marco de anticuerpo humano.

El término "unión" de acuerdo con la enseñanza se refiere preferiblemente a una unión específica.

De acuerdo con la presente enseñanza, un agente tal como un receptor de células T o un anticuerpo es capaz de unirse a un objetivo predeterminado si tiene una afinidad significativa por dicho objetivo predeterminado y se une a dicho objetivo predeterminado en ensayos estándar. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide por la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ). Preferiblemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  M o menos,  $10^{-6}$  M o menos,  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-11}$  M o menos, o  $10^{-12}$  M o menos.

Un agente no es (sustancialmente) capaz de unirse a un objetivo si no tiene una afinidad significativa por dicho objetivo y no se une de manera significativa, en particular no se une de manera detectable, a dicho objetivo en ensayos estándar. Preferiblemente, el agente no se une de manera detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración de hasta 2, preferiblemente 10, más preferiblemente 20, en particular 50 o 100  $\mu\text{g/ml}$  o más. Preferiblemente, un agente no tiene afinidad significativa por un objetivo si se une a dicho objetivo con una  $K_D$  que es al menos 10 veces, 100 veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  veces, o  $10^6$  veces mayor que la  $K_D$  para unirse al objetivo predeterminado al que el agente es capaz de unirse. Por ejemplo, si la  $K_D$  para la unión de un agente a la diana a la que el agente es capaz de unirse es  $10^{-7}$  M, la  $K_D$  para la unión a una diana por la cual el agente no tiene afinidad significativa sería al menos  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M, o  $10^{-1}$  M.

Un agente es específico para un objetivo predeterminado si es capaz de unirse a dicho objetivo predeterminado mientras que no es (sustancialmente) capaz de unirse a otros objetivos, es decir, no tiene afinidad significativa por otros objetivos y no se une significativamente a otros objetivos en los ensayos estándar. De acuerdo con la enseñanza, un agente es específico para CLDN6 si es capaz de unirse a CLDN6 pero no es (sustancialmente) capaz de unirse a otros objetivos. Preferiblemente, un agente es específico para CLDN6 si la afinidad y la unión a tales otras dianas no exceden significativamente la afinidad o la unión a proteínas no relacionadas con CLDN6 tales como la albúmina de suero bovino (BSA), la caseína, la albúmina de suero humano (BSA) o proteínas transmembrana que no son de claudina, como las moléculas MHC o el receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferiblemente, un agente es específico para un objetivo predeterminado si se une a dicho objetivo con un  $K_D$  que es al menos 10 veces, 100 veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  pliegue, o  $10^6$  veces más bajo que el  $K_D$  para unirse a un objetivo para el que no es específico. Por ejemplo, si la  $K_D$  para la unión de un agente al objetivo para el que es específico es  $10^{-7}$  M, la  $K_D$  para la unión a un objetivo para el que no es específica sería al menos  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M, o  $10^{-1}$  M.

La unión de un agente a un objetivo puede determinarse experimentalmente utilizando cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New

York, N Y (1992), y los métodos descritos en este documento. Las afinidades se pueden determinar fácilmente usando técnicas convencionales, como por ejemplo en diálisis de equilibrio; utilizando el instrumento BIAcore 2000, utilizando procedimientos generales descritos por el fabricante; por radioinmunoensayo usando antígenos diana radiomarcado; o por otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad se pueden analizar, por ejemplo, mediante el método de Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949). La afinidad medida de una interacción particular anticuerpo-antígeno puede variar si se mide en diferentes condiciones, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , se realizan preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Debe entenderse que los agentes peptídicos y proteicos descritos en el presente documento pueden proporcionarse in vitro o in vivo en forma de un ácido nucleico tal como el ARN que codifica el agente y/o en la forma de una célula huésped que comprende un ácido nucleico tal como ARN que codifica el agente. En particular, se puede usar una variedad de métodos para introducir construcciones CAR en células T que incluyen transfección de ADN no basada en virus, sistemas basados en transposones y sistemas basados en virus. La transfección de ADN no basada en virus tiene un bajo riesgo de mutagénesis de inserción. Los sistemas basados en transposones pueden integrar transgenes más eficientemente que los plásmidos que no contienen un elemento integrador. Los sistemas basados en virus incluyen el uso de  $\gamma$ -retrovirus y vectores lentivirales. Los  $\gamma$ -retrovirus son relativamente fáciles de producir, eficientemente y permanentemente transducen las células T, y se ha demostrado preliminarmente que son seguros desde un punto de vista de integración en las células T humanas primarias. Los vectores lentivirales también transducen de manera eficiente y permanente las células T, pero son más costosos de fabricar. También son potencialmente más seguros que los sistemas basados en retrovirus.

Los agentes peptídicos y proteicos descritos en el presente documento pueden administrarse a un paciente administrando un ácido nucleico tal como el ARN que codifica el agente y/o administrando una célula huésped que comprende un ácido nucleico tal como el ARN que codifica el agente. Un ácido nucleico cuando se administra a un paciente puede estar presente en forma desnuda o en un vehículo de administración adecuado, tal como en forma de liposomas o partículas virales, o dentro de una célula huésped. El ácido nucleico proporcionado puede producir el agente durante periodos de tiempo prolongados de manera sostenida, mitigando la inestabilidad al menos parcialmente observada para proteínas terapéuticas. Si se administra un ácido nucleico a un paciente sin estar presente dentro de una célula huésped, preferiblemente es captado por las células del paciente para la expresión del agente codificado por el ácido nucleico. Si se administra un ácido nucleico a un paciente mientras está presente dentro de una célula huésped, preferiblemente lo expresa la célula huésped dentro del paciente para producir el agente codificado por el ácido nucleico.

El término "ácido nucleico", como se usa en este documento, pretende incluir ADN y ARN, como ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas de forma recombinante y sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble. El ARN incluye ARN transcrito in vitro (ARN de IVT) o ARN sintético. De acuerdo con la enseñanza, un ácido nucleico es preferiblemente un ácido nucleico aislado.

Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector. El término "vector", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier vector conocido por los expertos en la técnica, incluidos vectores de plásmidos, vectores de cósmidos, vectores de fagos como el fago lambda, vectores virales como vectores adenovirales o baculovirales, o vectores de cromosomas artificiales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen expresión, así como vectores de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos, así como vectores virales y en general contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante ligada operativamente en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión in vitro. Los vectores de clonación se usan generalmente para diseñar y amplificar un cierto fragmento de ADN deseado y pueden carecer de secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos y preferiblemente está compuesta total o sustancialmente por residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo  $\beta$ -D-ribofuranosilo. El término incluye ARN de cadena doble, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante, así como ARN modificado que difiere del ARN natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como el extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos no naturales o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o análogos de ARN de origen natural.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término “ARN” incluye y preferiblemente se relaciona con “ARNm” que significa “ARN mensajero” y se relaciona con una “transcripción” que puede producirse usando ADN como plantilla y codifica un péptido o proteína. El ARNm comprende típicamente una región no traducida 5' (5'-UTR), una región codificante de proteína o péptido y una región no traducida 3' (3'-UTR). El ARNm tiene un medio tiempo limitado en las células e in vitro. Preferiblemente, el ARNm se produce por transcripción in vitro usando una plantilla de ADN. En una realización de la enseñanza, el ARN se obtiene por transcripción in vitro o síntesis química. La metodología de transcripción in vitro es conocida por los expertos. Por ejemplo, hay una variedad de kits de transcripción in vitro disponibles comercialmente.

En una realización de la presente enseñanza, el ARN es un ARN autorreplicante, tal como el ARN autorreplicante monocatenario. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN de cadena sencilla de sentido positivo. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN viral o ARN derivado de ARN viral. En una realización, el ARN autorreplicante es un ARN genómico alfaviral o se deriva de un ARN genómico alfaviral. En una realización, el ARN autorreplicante es un vector de expresión génica viral. En una realización, el virus es el virus del bosque Semliki. En una realización, el ARN autorreplicante contiene uno o más transgenes en al menos uno de dichos transgenes que codifican los agentes descritos en el presente documento. En una realización, si el ARN es ARN viral o se deriva de ARN viral, los transgenes pueden reemplazar parcial o completamente secuencias virales tales como secuencias virales que codifican proteínas estructurales. En una realización, el ARN autorreplicante es un ARN transcrito in vitro.

Para aumentar la expresión y/o la estabilidad del ARN usado de acuerdo con la presente enseñanza, puede modificarse, preferiblemente sin alterar la secuencia del péptido o proteína expresado.

El término “modificación” en el contexto de ARN como se usa de acuerdo con la presente enseñanza incluye cualquier modificación de ARN que no esté presente de forma natural en dicho ARN.

En una realización de la enseñanza, el ARN usado de acuerdo con la enseñanza no tiene 5'-trifosfatos destapados. La eliminación de tales 5'-trifosfatos no recubiertos se puede lograr tratando el ARN con una fosfatasa.

El ARN de acuerdo con la enseñanza puede tener ribonucleótidos sintéticos o naturales modificados para aumentar su estabilidad y/o disminuir la citotoxicidad. Por ejemplo, en una realización, en el ARN usado de acuerdo con la enseñanza, la 5-metilcitidina está parcial o completamente sustituida, preferiblemente completamente, por citidina. Alternativa o adicionalmente, en una realización, en el ARN usado de acuerdo con la enseñanza, la pseudouridina está parcial o completamente sustituida, preferiblemente completamente, por uridina.

En una realización, el término “modificación” se refiere a proporcionar un ARN con un 5'-cap o análogo 5'-cap. El término “5'-cap” se refiere a una estructura cap que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de mRNA y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al mRNA a través de un enlace inusual de trifosfato de 5' a 5'. En una realización, esta guanosina está metilada en la posición 7. El terminal “5'-cap convencional” se refiere a un ARN 5'-cap de origen natural, preferiblemente a la 7-metilguanosina cap (m7G). En el contexto de la presente enseñanza, el terminal “5'-cap” incluye un análogo de 5'-cap que se asemeja a la estructura de la capa de ARN y se modifica para poseer la capacidad de estabilizar el ARN si está unido al mismo, preferiblemente in vivo y/o en una célula.

La provisión de un ARN con un 5'-cap o análogo 5'-cap puede lograrse mediante la transcripción in vitro de una plantilla de ADN en presencia de dicho 5'-cap o análogo 5'-cap, en donde dicha 5'-cap es cotranscripcionalmente incorporado en la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, por transcripción in vitro, y la 5'-cap puede unirse al ARN posttranscripcionalmente utilizando enzimas de cobertura, por ejemplo, enzimas de cobertura de vaccinia virus.

El ARN puede comprender modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN utilizado en la presente enseñanza puede ser una extensión o truncamiento de la cola poli (A) que se produce naturalmente o una alteración de las regiones no traducidas (UTR) 5' o 3', como la introducción de una UTR que no está relacionada con la región de codificación de dicho ARN, por ejemplo, la inserción de una o más, preferiblemente dos copias de una 3'-UTR derivada de un gen de globina, como la globina alfa2, la globina alfa1, la beta-globina, preferiblemente beta-globina, más preferiblemente beta-globina humana.

Por lo tanto, para aumentar la estabilidad y/o la expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente enseñanza, se puede modificar para que esté presente junto con una secuencia poli-A, que tiene preferiblemente una longitud de 10 a 500, más preferiblemente 30 a 300, incluso más preferiblemente 65 a 200 y especialmente 100 a 150 residuos de adenosina. En una realización especialmente preferida, la secuencia de poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Además, la incorporación de dos o más regiones no traducidas en 3' (UTR) en la región no traducida en 3' de una molécula de ARN puede resultar en una mejora en la eficiencia de la traducción. En una realización particular, la 3'-UTR se deriva del gen de la  $\beta$ -globina humana.

El término “estabilidad” del ARN se refiere a la “vida media” del ARN, “vida media” se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, la cantidad o el número de moléculas. En el contexto de la presente enseñanza, la vida media de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN. La vida media del ARN puede influir en la “duración de la expresión” del ARN. Se puede esperar que el ARN que

5

tiene una vida media larga se exprese durante un período de tiempo prolongado.

En el contexto de la presente enseñanza, el término “transcripción” se refiere a un proceso, en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. De acuerdo con la presente enseñanza, el término “transcripción” comprende “transcripción in vitro”, en el que el término “transcripción in vitro” se refiere a un proceso en el que el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza

10

in vitro en un sistema libre de células, preferiblemente utilizando Extractos celulares apropiados. Preferiblemente, los vectores de clonación se aplican para la generación de transcripciones. Estos vectores de clonación se designan en general como vectores de transcripción y están de acuerdo con la presente enseñanza abarcada por el término “vector”.

El término “traducción” de acuerdo con la enseñanza se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o proteína.

15

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes, de acuerdo con la enseñanza, solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En realizaciones preferidas, un ácido nucleico está unido funcionalmente a secuencias de control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico. El término “homólogo” significa que los ácidos nucleicos también están funcionalmente unidos naturalmente y el término “heterólogo” significa que los ácidos nucleicos no están funcionalmente unidos naturalmente.

20

Un ácido nucleico y una secuencia de control de la expresión se unen “funcionalmente” entre sí, si están unidos covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o transcripción de dicho ácido nucleico esté bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia de control de la expresión. Si el ácido nucleico se va a traducir en una proteína funcional, entonces, con una secuencia de control de la expresión vinculada funcionalmente a una secuencia de codificación, la inducción de dicha secuencia de control de la expresión da como resultado la transcripción de dicho ácido nucleico, sin causar un cambio de marco en la secuencia de codificación, o dicha secuencia codificadora no puede traducirse a la proteína o péptido deseado.

25

El término “secuencia de control de expresión” o “elemento de control de expresión” comprende, de acuerdo con la enseñanza, promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En realizaciones particulares de la enseñanza, las secuencias de control de expresión pueden ser reguladas. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar en función de la especie o el tipo de célula, pero en general comprende las secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas que participan en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, como caja TATA, secuencia de límites, secuencia CAAT y similares. Más específicamente, las secuencias de control de la expresión 5' sin transcribir comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico funcionalmente ligado. Las secuencias de control de expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en sentido ascendente.

30

35

40

El término “expresión” se usa de acuerdo con la enseñanza en su significado más general y comprende la producción de ARN y/o péptidos o proteínas, por ejemplo, por transcripción y/o traducción. Con respecto al ARN, el término “expresión” o “traducción” se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. De acuerdo con la enseñanza, el término expresión también incluye una “expresión aberrante” o “expresión anormal”.

45

“Expresión aberrante” o “expresión anormal” significa de acuerdo con la enseñanza que la expresión está alterada, preferiblemente aumentada, en comparación con una referencia, por ejemplo, un estado en un sujeto que no tiene una enfermedad asociada con una expresión anómala o anormal de una proteína determinada, por ejemplo, un antígeno tumoral. Un aumento en la expresión se refiere a un aumento de al menos el 10%, en particular al menos el 20%, al menos el 50% o al menos el 100%, o más. En una realización, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano es reprimida.

50

El término “expresado específicamente” significa que una proteína se expresa esencialmente solo en un tejido u órgano específico. Por ejemplo, un antígeno tumoral expresado específicamente en la mucosa gástrica significa que dicha proteína se expresa principalmente en la mucosa gástrica y no se expresa en otros tejidos o no se expresa de manera significativa en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en las células de la mucosa gástrica y en un grado significativamente menor en cualquier otro tejido, como el testículo, se expresa específicamente en las células de la mucosa gástrica. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral también puede expresarse específicamente en condiciones

55



normales en más de un tipo de tejido u órgano, tal como en 2 o 3 tipos de tejido u órganos, pero preferiblemente en no más de 3 tipos diferentes de tejido u órgano. En este caso, el antígeno tumoral se expresa específicamente en estos órganos. Por ejemplo, si un antígeno tumoral se expresa en condiciones normales preferiblemente en una extensión aproximadamente igual en pulmón y estómago, dicho antígeno tumoral se expresa específicamente en pulmón y estómago.

De acuerdo con la enseñanza, el término "codificación de ácido nucleico" significa que el ácido nucleico, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, puede expresarse para producir una proteína o péptido que codifica.

Algunos aspectos de la enseñanza se basan en la transferencia adoptiva de células huésped que se transfectan in vitro con un ácido nucleico como el ARN que codifica un agente descrito en este documento y se transfiere a receptores como pacientes, preferiblemente después de la expansión ex vivo de bajas frecuencias de precursores a números celulares clínicamente relevantes. Las células huésped utilizadas para el tratamiento de acuerdo con la enseñanza pueden ser autólogas, alogénicas o singénicas a un receptor tratado.

El término "autólogo" se utiliza para describir cualquier cosa que se derive del mismo tema. Por ejemplo, "trasplante autólogo" se refiere a un trasplante de tejido u órganos derivados del mismo sujeto. Dichos procedimientos son ventajosos porque superan la barrera inmunológica que de otro modo da como resultado el rechazo.

El término "alogénico" se utiliza para describir todo lo que se deriva de diferentes individuos de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos.

El término "singénico" se utiliza para describir cualquier cosa que se derive de individuos o tejidos que tengan genotipos idénticos, es decir, gemelos o animales idénticos de la misma cepa consanguínea, o sus tejidos.

El término "heterólogo" se utiliza para describir algo que consiste en múltiples elementos diferentes. Como ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo a un individuo diferente constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del sujeto.

El término "transfección" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. Para los fines de la presente enseñanza, el término "transfección" también incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula o la captación de un ácido nucleico por dicha célula, en donde la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente. Por lo tanto, de acuerdo con la presente enseñanza, una célula para la transfección de un ácido nucleico descrito en el presente documento puede estar presente in vitro o in vivo, por ejemplo. la célula puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo de un paciente. De acuerdo con la enseñanza, la transfección puede ser transitoria o estable. Para algunas aplicaciones de transfección, es suficiente si el material genético transfectado se expresa solo de forma transitoria. Como el ácido nucleico introducido en el proceso de transfección generalmente no está integrado en el genoma nuclear, el ácido nucleico extraño se diluirá a través de la mitosis o se degradará. Las células que permiten la amplificación episómica de los ácidos nucleicos reducen en gran medida la velocidad de dilución. Si se desea que el ácido nucleico transfectado permanezca realmente en el genoma de la célula y sus células hijas, debe ocurrir una transfección estable. El ARN se puede transfectar en células para expresar transitoriamente su proteína codificada.

De acuerdo con la presente enseñanza, puede usarse cualquier técnica útil para introducir, es decir, transferir o transfectar, ácidos nucleicos en células. Preferiblemente, el ARN se transfecta en células mediante técnicas estándar. Tales técnicas incluyen electroporación, lipofección y microinyección. En una realización particularmente preferida de la presente enseñanza, el ARN se introduce en las células por electroporación.

La electroporación o electroporación se relaciona con un aumento significativo en la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana de plasma celular causada por un campo eléctrico aplicado externamente. Generalmente se usa en biología molecular como una forma de introducir alguna sustancia en una célula.

De acuerdo con la enseñanza, se prefiere que la introducción del ácido nucleico que codifica una proteína o péptido en las células dé como resultado la expresión de dicha proteína o péptido.

El término "péptido" de acuerdo con la enseñanza comprende oligo- y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 9 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 o más, preferiblemente 21 o más y preferiblemente hasta 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferiblemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan indistintamente en este documento.

De acuerdo con la enseñanza, un péptido puede incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En una realización, un péptido simplemente incluye aminoácidos naturales.

De acuerdo con la enseñanza, el término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que tiene una estructura diferente de aquellas de las 20 especies de aminoácidos naturales. Dado que los aminoácidos no naturales tienen estructuras similares a las de los aminoácidos naturales, los aminoácidos no naturales pueden clasificarse como derivados o análogos de aminoácidos naturales dados.

Preferiblemente, las proteínas y los péptidos descritos de acuerdo con la enseñanza se han aislado. Los términos "proteína aislada" o "péptido aislado" significan que la proteína o el péptido se han separado de su entorno natural. Una proteína o péptido aislado puede estar en un estado esencialmente purificado. El término "esencialmente purificado" significa que la proteína o el péptido está esencialmente libre de otras sustancias con las que está asociado en la naturaleza o in vivo.

La enseñanza dada en el presente documento con respecto a secuencias de aminoácidos específicas, por ejemplo, los que se muestran en la lista de secuencias, deben interpretarse de modo que también se relacionen con variantes de dichas secuencias específicas que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, Secuencias de aminoácidos que muestran propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas. Una propiedad importante es retener la unión de un péptido a una molécula de MHC y/o a un receptor de células T o de un receptor de células T a su objetivo o para mantener las funciones efectoras de una célula T. Preferiblemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un receptor de células T retiene la unión de dicho receptor de células T a la diana y preferiblemente funciona de dicho receptor de células T o células T que llevan el receptor de células T como se describió en este documento.

Por ejemplo, las secuencias mostradas en la lista de secuencias pueden modificarse para eliminar uno o más, preferiblemente todos los residuos de cisteína libres, en particular reemplazando los residuos de cisteína por aminoácidos distintos de la cisteína, preferiblemente serina, alanina, treonina, glicina, tirosina, leucina o metionina, más preferiblemente alanina o serina. Por ejemplo, la cisteína en la posición 45 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 33 del listado de secuencias o la correspondiente cisteína en una secuencia que comprende dicha secuencia puede modificarse de esta manera.

Los expertos en la técnica apreciarán que, en particular, las secuencias de las secuencias CDR, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a una diana. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas en este documento. Por "altamente homólogo" se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2, pueden hacerse sustituciones en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de modo que muestren una homología sustancial con las regiones específicamente divulgadas en este documento.

Una "variante" del péptido puede retener la inmunogenicidad de un péptido dado (por ejemplo, la capacidad de la variante para reaccionar con estirpes de células T o clones no disminuye sustancialmente en relación con el péptido dado). En otras palabras, la capacidad de una variante para reaccionar con líneas o clones de células T puede mejorarse o no cambiarse, en relación con el péptido dado, o puede disminuir en menos del 50%, y preferiblemente menos del 20%, en relación con el péptido dado.

Se puede identificar una variante evaluando su capacidad para unirse a una molécula de MHC. En una realización preferida, un péptido variante tiene una modificación tal que la capacidad del péptido variante para unirse a una molécula de MHC aumenta con respecto al péptido dado. La capacidad del péptido variante para unirse a una molécula de MHC puede incrementarse al menos 2 veces, preferiblemente al menos 3 veces, 4 veces o 5 veces con respecto a la de un péptido dado. De acuerdo con lo anterior, dentro de ciertas realizaciones preferidas, un péptido comprende una variante en la que 1 a 3 aminoácidos residen dentro de una porción inmunogénica están sustituidos de tal manera que la capacidad de reaccionar con estirpes de células T o clones es estadísticamente mayor que la del péptido no modificado. Dichas sustituciones están localizadas preferiblemente dentro de un sitio de unión MHC del péptido. Las sustituciones preferidas permiten una mayor unión a las moléculas MHC de clase I o clase II. Ciertas variantes contienen sustituciones conservativas.

El término "variante" de acuerdo con la enseñanza también incluye mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están presentes de forma natural. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuyo significado a menudo no está claro. La secuenciación completa de genes a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de una secuencia de ácido nucleico o aminoácido dada. El término "variante" abarcará todas las variantes modificadas postraduccionalmente y las variantes de conformación.

Para los fines de la presente enseñanza, las “variantes” de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de eliminación de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de eliminación de aminoácidos que comprenden la eliminación en el extremo de terminal N y/o de terminal C de la proteína también se denominan variantes de truncamiento de terminal N y/o de terminal C.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, uno o más residuos de aminoácidos se insertan en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible la inserción aleatoria con la selección apropiada del producto resultante.

Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones de terminal amino y/o carboxi de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos.

Las variantes de eliminación de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las eliminaciones pueden estar en cualquier posición de la proteína.

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo en la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que se encuentran en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas o péptidos homólogos y/o a la sustitución de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas son cambios de aminoácidos conservativos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio de aminoácidos conservativo implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos naturales se dividen generalmente en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82 %, 83%, 84%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60% %, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90% o aproximadamente el 100% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia se puede hacer con las herramientas conocidas en la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

La “similitud de secuencia” indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservativas de aminoácidos. La “identidad de secuencia” entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término “identidad de porcentaje” pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias que se compararán, obtenidas después de la mejor alineación, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen al azar y en más de toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, dicha comparación se realiza por segmento o por “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede producir, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Mates.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA,

BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package. Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Las secuencias de aminoácidos homólogas exhiben de acuerdo con la enseñanza al menos el 40%, en particular al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y preferiblemente al menos el 95%, al menos 98 o al menos 99% de identidad de los residuos de aminoácidos.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos descritas en el presente documento pueden ser preparadas fácilmente por el experto, por ejemplo, mediante manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para preparar proteínas y péptidos que tienen sustituciones, adiciones, inserciones o eliminaciones, se describe en detalle en Sambrook et al. (1989), por ejemplo. Además, los péptidos y variantes de aminoácidos descritos en el presente documento pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis de péptidos conocidas, tales como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida y métodos similares.

La enseñanza incluye derivados de los péptidos o proteínas descritos en el presente documento que están comprendidos por los términos "péptido" y "proteína". De acuerdo con la enseñanza, los "derivados" de proteínas y péptidos son formas modificadas de proteínas y péptidos. Dichas modificaciones incluyen cualquier modificación química y comprenden sustituciones, eliminaciones y/o adiciones únicas o múltiples de cualquier molécula asociada con la proteína o el péptido, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o péptidos. En una realización, los "derivados" de proteínas o péptidos incluyen aquellos análogos modificados resultantes de la glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, palmitoilación, miristoilación, isoprenilación, lipidación, alquilación, derivación, introducción de grupos protectores/bloqueadores, escisión proteolítica o unión a un Anticuerpos o contra otro ligando celular. El término "derivado" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas y péptidos. Preferiblemente, un péptido modificado tiene estabilidad incrementada y/o inmunogenicidad aumentada.

También se incluyen los miméticos de los péptidos. Dichos miméticos pueden comprender aminoácidos unidos a uno o más miméticos de aminoácidos (es decir, uno o más aminoácidos dentro del péptido pueden reemplazarse por un aminoácido mimético) o pueden ser totalmente miméticos no peptídicos. Un mimético de aminoácidos es un compuesto que es conformacionalmente similar a un aminoácido, por ejemplo, de manera que puede sustituirse por un aminoácido sin disminuir sustancialmente la capacidad de reaccionar con estirpes de células T o clones. Un mimético no peptídico es un compuesto que no contiene aminoácidos, y que tiene una conformación general que es similar a un péptido, por ejemplo, de tal manera que la capacidad del mimético para reaccionar con estirpes de células T o clones no disminuye sustancialmente con respecto a la capacidad de un péptido dado.

De acuerdo con la enseñanza, una variante, derivado, forma modificada, fragmento, parte o porción de una secuencia de aminoácidos, péptido o proteína tiene preferiblemente una propiedad funcional de la secuencia de aminoácidos, péptido o proteína, respectivamente, de la que se ha derivado, es decir, es funcionalmente equivalente. En una realización, una variante, derivado, forma modificada, fragmento, parte o porción de una secuencia de aminoácidos, péptido o proteína es inmunológicamente equivalente a la secuencia de aminoácidos, péptido o proteína, respectivamente, de la que se ha derivado. En una realización, la propiedad funcional es una propiedad inmunológica.

Una propiedad particular es la capacidad de formar un complejo con moléculas MHC y, cuando sea apropiado, generar una respuesta inmunitaria, preferiblemente estimulando las células citotóxicas o células T auxiliares.

El término "inmunológicamente equivalente" significa que la molécula inmunológicamente equivalente tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo de el efecto inmunológico, como la inducción de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, la fuerza y/o la duración de la reacción inmunitaria inducida, o la especificidad de la reacción inmunitaria inducida. En el contexto de la presente enseñanza, el término "inmunológicamente equivalente" se usa preferiblemente con respecto a los efectos inmunológicos o propiedades de un péptido o variante de péptido usado para la inmunización. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos es inmunológicamente equivalente a una secuencia de aminoácidos de referencia si dicha secuencia de aminoácidos cuando se expone al sistema inmunitario de un sujeto induce una reacción inmunitaria que tiene una especificidad de reaccionar con la secuencia de aminoácidos de referencia.

El término "derivado" significa de acuerdo con la enseñanza que una entidad particular, en particular una secuencia particular, está presente en el objeto del cual se deriva, en particular un organismo o molécula. En el caso de las secuencias de aminoácidos, especialmente las regiones de secuencia particulares, "derivadas"

en particular significa que la secuencia de aminoácidos relevante se deriva de una secuencia de aminoácidos en la que está presente.

El término “célula” o “célula huésped” se relaciona preferiblemente con una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta es preferiblemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente dicho término se relaciona de acuerdo con la enseñanza con cualquier célula que pueda transfectarse con un ácido nucleico exógeno. Preferiblemente, la célula cuando se transfecta con un ácido nucleico exógeno y se transfiere a un receptor puede expresar el ácido nucleico en el receptor. El término “célula” incluye células bacterianas; Otras células útiles son células de levadura, células fúngicas o células de mamíferos. Las células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas bacterianas gramnegativas tales como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus* y *Pseudomonas*, y cepas bacterianas grampositivas tales como cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* y *Lactococcus*. Las células fúngicas adecuadas incluyen células de especies de *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*. Las células de levadura adecuadas incluyen células de especies de *Saccharomyces* (ejemplo de *Tor*, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizo Saccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolicd*), y *Hansenula*. Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, 293 HEK y similares. Sin embargo, también se pueden usar células de anfibios, células de insectos, células de plantas y cualquier otra célula usada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas. Las células de mamífero son particularmente preferidas para la transferencia adoptiva, como las células de humanos, ratones, hámsters, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de un gran número de tipos de tejidos e incluyen células primarias y estirpes celulares como las células del sistema inmunitario, en particular células presentadoras de antígenos, como células dendríticas y células T, células madre como células madre hematopoyéticas y células madre y mesenquimales otros tipos de células. Una célula presentadora de antígeno es una célula que muestra el antígeno en el contexto del complejo de histocompatibilidad principal en su superficie. Las células T pueden reconocer este complejo utilizando su receptor de células T (TCR).

Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico preferiblemente expresa el péptido o proteína codificada por el ácido nucleico.

La célula puede ser una célula recombinante y puede secretar el péptido o proteína codificado, puede expresarlo en la superficie y preferiblemente puede expresar adicionalmente una molécula de MHC que se une a dicho péptido o proteína o un producto de procesamiento del mismo. En una realización, la célula expresa la molécula MHC de manera endógena. En una realización adicional, la célula expresa la molécula de MHC y/o el péptido o proteína o el producto de procesamiento de la misma de manera recombinante. La célula es preferiblemente no proliferativa. En una realización preferida, la célula es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

El término “expansión clonal” se refiere a un proceso en el que se multiplica una entidad específica. En el contexto de la presente enseñanza, el término se usa preferiblemente en el contexto de una respuesta inmunológica en la que los linfocitos son estimulados por un antígeno, proliferan, y se amplifica el linfocito específico que reconoce dicho antígeno. Preferiblemente, la expansión clonal conduce a la diferenciación de los linfocitos.

Una enfermedad asociada con la expresión de antígenos puede detectarse basándose en la presencia de células T que reaccionan específicamente con un péptido en una muestra biológica. Dentro de ciertos métodos, una muestra biológica que comprende células T CD4+ y/o CD8+ aisladas de un paciente se incuba con un péptido de la enseñanza, un ácido nucleico que codifica dicho péptido y/o una célula presentadora de antígeno que expresa y/o presenta al menos una porción inmunogénica de dicho péptido, y se detecta la presencia o ausencia de activación específica de las células T. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células T aisladas. Por ejemplo, las células T pueden aislarse de un paciente mediante técnicas de rutina (como la centrifugación con gradiente de densidad Ficoll/Hypaque de linfocitos de sangre periférica). Para las células T CD4+, la activación se detecta preferiblemente evaluando la proliferación de las células T. Para las células T CD8+, la activación se detecta preferiblemente evaluando la actividad citolítica. Un nivel de proliferación que es al menos dos veces mayor y/o un nivel de actividad citolítica que es al menos un 20% mayor que en sujetos libres de enfermedad indica la presencia de una enfermedad asociada con la expresión de antígenos en el sujeto.

“Reducir” o “inhibir” como se usa aquí significa la capacidad de provocar una disminución general, preferiblemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente de 50% o más, y más preferiblemente de 75% o mayor, en el nivel. El término “inhibir” o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente a cero.

Términos tales como “aumento” o “mejora” se refieren preferiblemente a un aumento o mejora en aproximadamente al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, más

preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, incluso más preferiblemente al menos el 80%, y lo más preferiblemente al menos el 100%.

Los agentes, composiciones y métodos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar a un sujeto con una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad caracterizada por la presencia de células enfermas que expresan CLDN6 y preferiblemente presentan CLDN6 en el contexto de las moléculas MHC. Los ejemplos de enfermedades que se pueden tratar y/o prevenir abarcan todas las enfermedades que expresan CLDN6. Las enfermedades particularmente preferidas son las enfermedades del cáncer.

Los agentes, composiciones y métodos descritos en el presente documento también pueden usarse para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en el presente documento.

Los términos “tejido normal” o “condiciones normales” se refieren a tejido sano o las condiciones en un sujeto sano, es decir, condiciones no patológicas, en el que “sano” significa preferiblemente no canceroso.

El término “enfermedad” se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una afección médica asociada con síntomas y signos específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originarios de una fuente externa, como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, como enfermedades autoinmunitarias. En los seres humanos, la “enfermedad” a menudo se usa más ampliamente para referirse a cualquier condición que cause dolor, disfunción, angustia, problemas sociales o muerte al individuo afectado, o problemas similares para quienes están en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, a veces incluye lesiones, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, conductas desviadas y variaciones atípicas de estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros fines, se pueden considerar categorías distinguibles. Las enfermedades generalmente afectan a las personas, no solo físicamente, sino también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de la vida y la personalidad. De acuerdo con la enseñanza, el término “enfermedad” incluye cáncer, en particular aquellas formas de cáncer descritas en el presente documento. Cualquier referencia aquí al cáncer o formas particulares de cáncer también incluye metástasis del cáncer del mismo. En una realización preferida, una enfermedad a tratar de acuerdo con la presente solicitud implica células que expresan CLDN6 y, opcionalmente, presentan CLDN6 en el contexto de moléculas de MHC.

“Enfermedades que involucran células que expresan CLDN6” o expresiones similares significa de acuerdo con la enseñanza que CLDN6 se expresa en células de un tejido u órgano enfermo. En una realización, la expresión de CLDN6 en células de un tejido u órgano enfermo aumenta en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un aumento se refiere a un aumento de al menos el 10%, en particular al menos el 20%, al menos el 50%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos el 500%, al menos el 1000%, al menos el 10000% o incluso más. En una realización, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano es reprimida. De acuerdo con la enseñanza, las enfermedades que implican células que expresan CLDN6 incluyen enfermedades de cáncer. Además, de acuerdo con la enseñanza, las enfermedades cancerosas son preferiblemente aquellas en las que las células cancerosas expresan CLDN6.

Los términos “enfermedad del cáncer” o “cáncer” se refieren o describen la condición fisiológica en un individuo que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, los ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer de hueso, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cuello de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer uterino, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma hipofisario. El término “cáncer” de acuerdo con la enseñanza también comprende metástasis de cáncer. Preferiblemente, una “enfermedad de cáncer” se caracteriza por células que expresan CLDN6 y una célula de cáncer que expresa CLDN6.

Una célula enferma es preferiblemente una célula que expresa CLDN6, estando dicho CLDN6 preferiblemente presente en la superficie de dicha célula como proteína transmembrana y/o siendo presentado por dicha célula en el contexto de MHC tal como MHC I. Una célula que expresa CLDN6 es preferiblemente una célula cancerosa, preferiblemente de los cánceres descritos en el presente documento.

En una realización, una enfermedad de cáncer es una enfermedad maligna que se caracteriza por las propiedades de anaplasia, invasividad y metástasis. Un tumor maligno puede contrastarse con un tumor benigno no canceroso, ya que un tumor maligno no se autolimita en su crecimiento, es capaz de invadir tejidos adyacentes y puede propagarse a tejidos distantes (metástasis), mientras que un tumor benigno no tiene ninguna de esas propiedades.

De acuerdo con la enseñanza, el término “tumor” o “enfermedad tumoral” se refiere a una inflamación o lesión formada por un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas o células tumorales). Por “célula tumoral” se entiende una célula anormal que crece por una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una

5 falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa de tejido distinta, que puede ser benigna, premaligna o maligna.

De acuerdo con la enseñanza, un “carcinoma” es un tumor maligno derivado de células epiteliales. Este grupo representa los cánceres más comunes, incluidas las formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon.

10 El “adenocarcinoma” es un cáncer que se origina en el tejido glandular. Este tejido también es parte de una categoría de tejido más grande conocida como tejido epitelial. El tejido epitelial incluye la piel, glándulas y una variedad de otros tejidos que recubren las cavidades y órganos del cuerpo. El epitelio se deriva embriológicamente de ectodermo, endodermo y mesodermo. Para ser clasificadas como adenocarcinoma, las células no necesariamente tienen que formar parte de una glándula, siempre que tengan propiedades

15 secretoras. Esta forma de carcinoma puede ocurrir en algunos mamíferos superiores, incluidos los humanos. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que se derivan, mientras que los mal diferenciados no. Al teñir las células de una biopsia, un patólogo determinará si el tumor es un adenocarcinoma o algún otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas pueden surgir en muchos tejidos del cuerpo debido a la naturaleza ubicua de las glándulas dentro del cuerpo. Si bien cada glándula no puede secretar la

20 misma sustancia, siempre que haya una función exocrina en la célula, se considera glandular y su forma maligna se denomina adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos y con frecuencia hacen metástasis si se les da suficiente tiempo para hacerlo. El adenocarcinoma de ovario es el tipo más común de carcinoma de ovario. Incluye los adenocarcinomas serosos y mucinosos, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometriode.

25 El linfoma y la leucemia son tumores malignos derivados de células hematopoyéticas (formadoras de sangre).

El tumor blástico o blastoma es un tumor (generalmente maligno) que se asemeja a un tejido inmaduro o embrionario. Muchos de estos tumores son más comunes en los niños.

Por “metástasis” se entiende la propagación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células

30 malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar a la cavidad y los vasos del cuerpo, y luego, después de ser transportados por la sangre, infiltración de órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En

35 una realización, el término “metástasis” de acuerdo con la enseñanza se refiere a “metástasis a distancia” que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales. En una realización, el término “metástasis” de acuerdo con la enseñanza se refiere a metástasis en ganglios linfáticos.

40 Las células de un tumor secundario o metastásico son como las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que, si el cáncer de ovario se metastatiza en el hígado, el tumor secundario está formado por células ováricas anormales, no por células hepáticas anormales. El tumor en el hígado se llama cáncer de ovario metastásico, no cáncer de hígado.

Una recaída o recurrencia ocurre cuando una persona se ve afectada nuevamente por una condición que la afectó en el pasado. Por ejemplo, si un paciente ha sufrido una enfermedad tumoral, ha recibido un tratamiento exitoso de dicha enfermedad y nuevamente desarrolla dicha enfermedad, dicha enfermedad recientemente desarrollada puede considerarse recaída o recidiva. Sin embargo, de acuerdo con la enseñanza, una recaída o recurrencia de una enfermedad tumoral puede, pero no necesariamente, ocurrir en el sitio de la enfermedad tumoral original. Así, por ejemplo, si un paciente ha sufrido un tumor ovárico y ha recibido un tratamiento exitoso, una recaída o recurrencia puede ser la aparición de un tumor ovárico o la aparición de un tumor en un

50 sitio diferente al ovario. Una recaída o recurrencia de un tumor también incluye situaciones en las que un tumor ocurre en un sitio diferente al sitio del tumor original, así como en el sitio del tumor original. Preferiblemente, el tumor original para el que el paciente ha recibido un tratamiento es un tumor primario y el tumor en un sitio diferente al sitio del tumor original es un tumor secundario o metastásico.

El término “tratamiento” o “tratamiento terapéutico” se refiere a cualquier tratamiento que mejore el estado de salud y/o prolongue (aumente) la vida útil de un individuo. Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o severidad de los síntomas en un individuo y/o disminuir la recurrencia en un individuo que actualmente tiene o que previamente ha tenido una enfermedad.

Los términos “tratamiento profiláctico” o “tratamiento preventivo” se refieren a cualquier tratamiento que tenga la intención de prevenir que una enfermedad ocurra en un individuo. Los términos “tratamiento profiláctico” o “tratamiento preventivo” se usan aquí de manera intercambiable.

Los términos “individuo” y “sujeto” se usan aquí de manera intercambiable. Se refieren a seres humanos, primates no humanos u otros mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, cerdos, ovejas, caballos o primates) que pueden padecer o son susceptibles a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) pero puede o no tener la enfermedad o trastorno. En muchas realizaciones, el individuo es un ser humano. A menos que se indique lo contrario, los términos “individual” y “sujeto” no denotan una edad en particular, y por lo tanto abarcan a adultos, ancianos, niños y recién nacidos. En realizaciones preferidas de la presente enseñanza, el “individuo” o “sujeto” es un “paciente”. El término “paciente” significa de acuerdo con la enseñanza un sujeto para tratamiento, en particular un sujeto enfermo.

Por “estar en riesgo” se entiende un sujeto, es decir, un paciente, que se identifica con una probabilidad mayor de lo normal de desarrollar una enfermedad, en particular el cáncer, en comparación con la población general. Además, un sujeto que ha padecido o padece actualmente una enfermedad, en particular el cáncer, es un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, ya que tal sujeto puede continuar desarrollando una enfermedad. Los sujetos que actualmente tienen o han tenido un cáncer también tienen un mayor riesgo de metástasis del cáncer.

El término “inmunoterapia” se relaciona con un tratamiento que involucra una reacción inmunitaria específica.

En el contexto de la presente enseñanza, términos tales como “proteger”, “prevenir”, “profiláctico”, “preventivo” o “protector” se refieren a la prevención o tratamiento o tanto de la aparición como de la propagación de una enfermedad en un sujeto y, en particular, para minimizar la posibilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad o para retrasar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, una persona en riesgo de un tumor, como se describió anteriormente, sería un candidato para la terapia para prevenir un tumor.

Una administración profiláctica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración profiláctica de un agente o composición de la enseñanza, protege preferiblemente al receptor del desarrollo de una enfermedad. Una administración terapéutica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración terapéutica de un agente o composición de la enseñanza, puede conducir a la inhibición del progreso/crecimiento de la enfermedad. Esto comprende la desaceleración del progreso/crecimiento de la enfermedad, en particular una interrupción de la progresión de la enfermedad, que preferiblemente conduce a la eliminación de la enfermedad.

La inmunoterapia se puede realizar utilizando cualquiera de una variedad de técnicas, en las que los agentes proporcionados en el presente documento funcionan preferiblemente para eliminar las células que expresan CLDN6 de un paciente. Dicha eliminación puede tener lugar como resultado de mejorar o inducir una respuesta inmunitaria en un paciente específico para CLDN6 o una célula que expresa CLDN6 y/o que presenta CLDN6 en el contexto de las moléculas MHC.

En ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede ser una inmunoterapia activa, en la que el tratamiento se basa en la estimulación in vivo del sistema inmunitario del huésped endógeno para que reaccione contra las células enfermas con la administración de agentes modificadores de la respuesta inmunitaria (como los péptidos y los ácidos nucleicos como se proporciona en este documento).

En otras realizaciones, la inmunoterapia puede ser una inmunoterapia pasiva, en la que el tratamiento implica la administración de agentes con reactividad inmunitaria al tumor establecida (como las células efectoras) que pueden mediar directa o indirectamente los efectos antitumorales y no necesariamente depende de un sistema inmunitario del huésped intacto. Los ejemplos de células efectoras incluyen los linfocitos T (como los linfocitos T citotóxicos CD8+ y los linfocitos T auxiliares CD4+), y las células presentadoras de antígenos (como las células dendríticas y los macrófagos). Los receptores de células T específicos para los péptidos CLDN6 enumerados en este documento y los receptores artificiales de células T específicos para CLDN6 pueden transferirse a células efectoras para inmunoterapia adoptiva.

Como se indicó anteriormente, los péptidos inmunorreactivos como se proporcionan en el presente documento se pueden usar para expandir rápidamente los cultivos de células T específicas de antígeno con el fin de generar un número suficiente de células para la inmunoterapia. En particular, las células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, macrófagos, monocitos, fibroblastos y/o células B, pueden pulsarse con péptidos inmunorreactivos o transfectarse con uno o más ácidos nucleicos usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Las células efectoras cultivadas para uso en terapia deben poder crecer y distribuirse ampliamente, y sobrevivir en el largo plazo in vivo. Los estudios han demostrado que las células efectoras cultivadas se pueden inducir para que crezcan in vivo y sobrevivan a largo plazo en números sustanciales mediante la estimulación repetida con antígeno suplementado con IL-2 (ver, por ejemplo, Cheever et al. (1997), Revisiones inmunológicas 157, 177.



Alternativamente, un ácido nucleico que expresa un péptido mencionado en el presente documento puede introducirse en células presentadoras de antígeno tomadas de un paciente y propagarse clonalmente ex vivo para el trasplante de nuevo en el mismo paciente.

5 Las células transfectadas pueden reintroducirse en el paciente utilizando cualquier medio conocido en la técnica, preferiblemente en forma estéril mediante administración intravenosa, intracavitaria, intraperitoneal o intratumoral.

10 Los métodos divulgados en el presente documento pueden implicar la administración de células T autólogas que se han activado en respuesta a un péptido o célula presentadora de antígeno que expresa péptidos. Dichas células T pueden ser CD4+ y/o CD8+, y pueden proliferar como se describió anteriormente. Las células T pueden administrarse al sujeto en una cantidad eficaz para inhibir el desarrollo de una enfermedad.

El término "inmunización" o "vacunación" describe el proceso de tratamiento de un sujeto con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria por razones terapéuticas o profilácticas.

El término "in vivo" se relaciona con la situación en un sujeto.

15 De acuerdo con la enseñanza, una "muestra" puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente enseñanza, en particular una muestra biológica tal como una muestra de tejido, incluyendo fluidos corporales, y/o una muestra celular, y puede obtenerse de la manera convencional tal como por biopsia de tejido, incluida la biopsia por punción, y por extracción de sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros líquidos corporales. De acuerdo con la enseñanza, el término "muestra" también incluye muestras procesadas tales como fracciones o aislados de muestras biológicas, por ejemplo. Aislamientos de ácido nucleico y  
20 péptido/proteína.

Los compuestos y agentes descritos en el presente documento pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

25 Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza son preferiblemente estériles y contienen una cantidad eficaz de los agentes descritos en este documento y, opcionalmente, de otros agentes como se describe en este documento para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan usualmente en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse de una manera conocida per se. Una composición farmacéutica puede, por ejemplo, estar en forma de solución o suspensión.

30 Una composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias tampón, conservantes, vehículos, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

35 Las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden usarse para preparar sales farmacéuticamente aceptables y se incluyen en la enseñanza. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden de manera no limitativa las preparadas a partir de los siguientes ácidos: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

40 Las sustancias tampón adecuadas para uso en una composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Los conservantes adecuados para uso en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

Una formulación inyectable puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como el lactato de Ringer.

45 El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina para facilitar, mejorar o permitir la aplicación.

De acuerdo con la enseñanza, el término "portador" también incluye uno o más rellenos, diluyentes o sustancias de encapsulación sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para la administración a un paciente.

50 Posibles sustancias portadoras para administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de sodio, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

El término “excipiente” cuando se usa en este documento pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes aromatizantes, o colorantes.

- 5 Los agentes y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse por cualquier vía convencional, tal como por administración parenteral que incluye mediante inyección o infusión. La administración es preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

- 10 Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden habitualmente una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de vehículos y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, generalmente se utilizan aceites fijos estériles como solución o medio de suspensión.

- 15 Los agentes y composiciones descritos en el presente documento se administran en cantidades eficaces. Una “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con otras dosis. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser un retardo de la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o dicha afección.

- 20 Una cantidad efectiva de un agente o composición descrita aquí dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluyendo la edad, condición fisiológica, tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si está presente), la vía de administración específica y factores similares. De acuerdo con lo anterior, las dosis administradas de los agentes descritos en el presente documento pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso de  
25 que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas logradas por una vía de administración diferente, más localizada).

- Los agentes y composiciones descritos en este documento pueden administrarse a pacientes, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como los descritos en este documento. Los pacientes preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse  
30 administrando los agentes y composiciones descritos en el presente documento. Esto incluye trastornos que involucran células caracterizadas por la expresión de CLDN6.

Por ejemplo, en una realización, los agentes descritos en este documento pueden usarse para tratar a un paciente con una enfermedad de cáncer, por ejemplo, una enfermedad de cáncer tal como se describe en este documento caracterizada por la presencia de células de cáncer que expresan CLDN6.

- 35 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la enseñanza también pueden usarse para la inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en el presente documento.

- La composición farmacéutica de la enseñanza puede administrarse junto con sustancias que aumentan la inmunidad suplementaria tales como uno o más adyuvantes y puede comprender una o más sustancias que  
40 potencian la inmunidad para aumentar aún más su eficacia, preferiblemente para lograr un efecto sinérgico de la inmunoestimulación. El término “adyuvante” se refiere a compuestos que prolongan o potencian o aceleran una respuesta inmunitaria. Varios mecanismos son posibles a este respecto, dependiendo de los diversos tipos de adyuvantes. Por ejemplo, compuestos que permiten la maduración de la DC, por ejemplo, Los lipopolisacáridos o el ligando CD40 forman una primera clase de adyuvantes adecuados. En general, cualquier  
45 agente que influya en el sistema inmunitario del tipo de una “señal de peligro” (LPS, GP96, ARNcd, etc.) o citoquinas, como GM-CSF, puede usarse como adyuvante que permite intensificar una respuesta inmunitaria y/o influenciado de manera controlada. Los oligodesoxinucleótidos CpG también pueden usarse opcionalmente en este contexto, aunque deben considerarse los efectos secundarios que se producen en ciertas circunstancias, como se explicó anteriormente. Los adyuvantes particularmente preferidos son citoquinas, tales  
50 como monocinas, linfocinas, interleuquinas o quimiocinas, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, LT- $\alpha$ , o factores de crecimiento, por ejemplo, hGH Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund o aceite tal como Montanide®, el más preferido es Montanide® ISA51. Los lipopéptidos, tales como Pam3Cys, también son adecuados para uso como adyuvantes en la composición farmacéutica de la presente enseñanza.

- 55 La composición farmacéutica puede administrarse local o sistémicamente, preferiblemente sistémicamente.

El término “administración sistémica” se refiere a la administración de un agente de tal manera que el agente se distribuye ampliamente en el cuerpo de un individuo en cantidades significativas y desarrolla un efecto deseado. Por ejemplo, el agente puede desarrollar su efecto deseado en la sangre y/o alcanzar su sitio de

acción deseado a través del sistema vascular. Las vías sistémicas típicas de administración incluyen la administración introduciendo el agente directamente en el sistema vascular o la administración oral, pulmonar o intramuscular en la que el agente se adsorbe, ingresa al sistema vascular y se lleva a uno o más sitios deseados de acción a través de la sangre.

- 5 De acuerdo con la presente enseñanza, se prefiere que la administración sistémica sea por administración parenteral. El término "administración parenteral" se refiere a la administración de un agente tal que el agente no pase el intestino. El término "administración parenteral" incluye administración intravenosa, administración subcutánea, administración intradérmica o administración intraarterial, pero no se limita a esto.

La administración también se puede llevar a cabo, por ejemplo, por vía oral, intraperitoneal o intramuscular.

- 10 Los agentes y composiciones proporcionados en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con regímenes terapéuticos convencionales tales como cirugía, irradiación, quimioterapia y/o trasplante de médula ósea (autóloga, singénica, alogénica o no relacionada).

La presente enseñanza se describe en detalle mediante las figuras y ejemplos a continuación, que se usan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Debido a la descripción y los ejemplos, las formas de realización adicionales que están incluidas igualmente en la enseñanza son accesibles al experto.

15

#### Figuras

Figura 1: Representación del complejo TCR-CD3. Los motivos de activación a base de inmunorreceptor tirosina (ITAM) intracitoplásmicos CD3 están indicados como cilindros (adaptados del "The T cell receptor facts book", MP Lefranc, G Lefranc, 2001).

- 20 Figura 2: El diseño de generaciones sucesivas de CARs. Representación esquemática de las diferentes generaciones de CAR (1G, primera generación, 2G, segunda generación, 3G, tercera generación). La primera generación contiene scFvs extracelulares y la citotoxicidad mediadora de la cadena CD3 $\zeta$ /ZAP70 citoplásmica, la segunda generación adicionalmente promueve la proliferación de CD28/PI3K y la tercera generación, además de 4-1 BB o OX40/TRAF sostiene la supervivencia celular (Casucci, M. et al. (2011) 2: 378-382).

- 25 Figura 3: Representación esquemática de los diferentes formatos de receptores para la redirección de células T contra CLDN6. Izquierda: una segunda generación de CAR que consiste en un fragmento scFv específico de CLDN6, un dominio separador derivado de IgG1, un coestimulador de CD28 y un dominio de señalización de CD3 $\zeta$  (CAR-28 $\zeta$ ); medio: un nuevo formato CAR basado en el enlace del scFv con el dominio constante de la cadena TCR $\beta$  murina y la coexpresión del dominio constante de la cadena TCR $\alpha$  murina (CAR/C $\alpha$ ); derecha:  
30 un TCR murino compuesto por cadenas TCR  $\alpha/\beta$  ( $\mu$ , TCR murino);

Figura 4: Expresión de claudina-6 en tejidos normales y diferentes tipos de cáncer. La expresión de ARNm de CLDN6 se analizó mediante qRT-PCR en diferentes muestras de tejido normal y 47 de carcinoma de ovario.

- Figura 5. Plataforma tecnológica para el aislamiento y validación de TCR. El enfoque integra todos los pasos desde el aislamiento de células T específicas de antígeno (arriba) hasta la clonación de TCR (centro) y la validación de TCR (abajo). Los ratones transgénicos HLA-A2/DR1 se inmunizan con un ARNm que codifica el antígeno tumoral. Las células del bazo de estos ratones se analizan para determinar la reactividad ex vivo  
35 contra el antígeno respectivo por IFN $\gamma$ -ELISPOT y se aíslan células T CD8+ murinas específicas de antígeno después de la reestimulación in vitro basada en la expresión de CD137 inducida por activación por citometría de flujo (arriba). Las células individuales se recolectan en placas de múltiples pozos y se someten a la síntesis y el enriquecimiento de ADNc de la primera cadena mediante una etapa de amplificación por PCR global. Las regiones variables de TCR  $\alpha/\beta$  se clonan en vectores para la transcripción in vitro (IVT) que contienen los casetes de región constante (centro). Los ARN de la cadena  $\alpha/\beta$  de TCR se transfieren a las células T CD8+ humanas, se cultivan con APC que expresan el antígeno apropiado y las moléculas HLA y se analizan para la reprogramación funcional de las células T modificadas por ingeniería genética (parte inferior).

- 45 Figura 6: Reactividad ex vivo de células de bazo de ratones transgénicos HLA-A\*02 inmunizados contra péptidos derivados de CLDN6 analizados mediante el ensayo IFN $\gamma$ -ELISPOT. Se predijeron los péptidos de unión específicos de HLA-A\*02 CLDN6 aplicando un algoritmo específico (Rammensee H. et al. (1999) Immunogenetics 50, 213-9). Las células del bazo se analizaron para determinar la reactividad contra el grupo de péptidos CLDN6 o los péptidos derivados de CLDN6 que se unen a HLA-A\*02 A2-1-6. Control positivo:  
50 células de bazo tratadas con PMA; control negativo: un conjunto de péptidos irrelevantes (HIV-gag), péptidos nonamer irrelevantes (PLAC1-31-39).

- Figura 7: Clasificación por citometría de flujo de células T CD8+ murinas específicas de CLDN6 de ratones transgénicos HLA-A\*02 después de la reestimulación in vitro. Las células T CD8+/CD137+ individuales se  
55 aislaron mediante citometría de flujo y se recolectaron en placas de múltiples pozos para la clonación de TCR después de la reestimulación de células de bazo con el grupo de péptidos superpuestos de CLDN6. Control: células del bazo reestimuladas con un grupo de péptidos irrelevantes.

Figura 8: Pruebas de especificidad de TCR aisladas de células T CD8+ de ratones inmunizados con CLDN6. Las células T CD8+ de un donante sano HLA-A\*02 positivo se transfectaron con ARN de cadena TCR- $\alpha/\beta$  y se probaron para el reconocimiento de células K562-A2 transfectadas con ARN CLDN6 o se pulsaron con péptidos CLDN6 de 15 mer superpuestos (= grupo de C16) o péptidos de unión CLDN6 HLA-A\*02 (C16-A2-1, C16-A2-2) por IFN $\gamma$ -ELISPOT. Controles negativos: conjunto de péptidos irrelevantes, péptidos 9mer irrelevantes; Control positivo: SEB

Figura 9: Expresión superficial de TCR murinos específicos de CLDN6 en células T CD8+ preactivadas humanas. Las células T CD8+ se preactivaron con OKT3 y se transfectaron con 20  $\mu$ g de TCR  $\alpha/\beta$  RNA. 20 h después de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD8 conjugado con PE y un anticuerpo conjugado con APC que reconocía el dominio constante murino de la cadena  $\beta$  de TCR. Las células fueron bloqueadas en linfocitos individuales.

Figura 10: Lisis de células tumorales mediada por TCR específicos de CLDN6. Las células T CD8+ previamente activadas se transfectaron con 20  $\mu$ g de ARN TCR  $\alpha/\beta$  y se cultivaron 20 h más tarde junto con estirpes de células tumorales (SK-Mel-37) negativo o (PA1-Luc; NIH-OvCar3) positivo CLDN6 que expresan HLA-A\*02 con una relación E:T (célula efectora: célula diana) de 30:1. La lisis específica se analizó mediante un ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa después de 4 h de cocultivo.

Figura 11: Proliferación dependiente de la dosis mediada por TCR específicos de CLDN6 en respuesta a células diana que expresan CLDN6. Las células T CD8+ se transfectaron con 20  $\mu$ g de ARN de TCR, se marcaron con CFSE y se cultivaron con monocitos autólogos transfectados con cantidades tituladas de ARN de CLDN6. Después de 4 días de cocultivo, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD8 marcado con APC-Cy7. A) La proliferación específica se analizó mediante citometría de flujo basada en la dilución del colorante de proliferación CFSE. Las gráficas de puntos muestran linfocitos T CD8+ vivos después del cocultivo con monocitos transfectados con 1  $\mu$ g CLDN6-ARN. B) Las barras muestran el porcentaje de células T CD8+ en proliferación.

Figura 12: Expresión de superficie de construcciones CAR específicas de CLDN6 en células T CD4+ y CD8+ humanas en reposo. Las PBMC se transfectaron con 10  $\mu$ g de ARN CAR. 20 h después de la electroporación, las células se tiñeron con un anti-CD8 conjugado con PE, un anti-CD4 conjugado con FITC y un anticuerpo específico de idiotipo marcado con Dylight-650. Las células se clasificaron en células T CD4+ o CD8+ individuales.

Figura 13: Lisis de células tumorales mediada por diferentes formatos de receptores de direccionamiento CLDN-6. Las células T CD8+ preactivadas se transfectaron con ARN de CAR o TCR y se cultivaron 20 h más tarde junto con estirpes celulares de tumor PA1 y MDA-MB-231-Luc positivas para CLDN6 o negativas para CLDN6 en diferentes relaciones E:T. La lisis específica se analizó mediante un ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa después de 4 h de cocultivo.

Figura 14: Proliferación específica de antígeno mediada por CAR específica de CLDN6 en respuesta a células diana que expresan CLDN6. Las células T CD8+ se transfectaron con 20  $\mu$ g de ARN de TCR o CAR, se marcaron con CFSE y se cultivaron conjuntamente con iDC autóloga transfectada con CLDN6 o ARN de control durante 4 días. A) La expresión de la superficie de TCR/CAR se analizó mediante citometría de flujo después de la tinción con un anticuerpo específico de TCR $\beta$  conjugado con APC murino o un anticuerpo específico de idiotipo conjugado con Dylight650. La proliferación específica se analizó mediante citometría de flujo basada en la dilución del colorante de proliferación CFSE.

Figura 15: Expresión superficial de diferentes mutantes de construcciones de CLDN6-CAR-28 $\zeta$  con cisteína 46 mutada en células T CD8+ preactivadas. Las células T CD8+ se preactivaron con OKT3 y se transfectaron con 20  $\mu$ g de ARN CAR. 20 h después de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD8 conjugado con PE y un anticuerpo específico de idiotipo etiquetado con Dylight650. Las células fueron bloqueadas en singletes y linfocitos.

Figura 16: Expresión superficial de diferentes mutantes de construcciones de CAR-28 $\zeta$  con cisteína 46 mutada en células T CD8+ preactivadas de tres donantes diferentes. Las células T CD8+ se preactivaron con OKT3 y se transfectaron con 20  $\mu$ g de ARN CAR. 20 h después de la electroporación, las células se tiñeron con un anticuerpo específico de idiotipo etiquetado con Dylight650. Las células se clasificaron en linfocitos T CD8+ que expresan CAR. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes. Arriba: se muestra el porcentaje de células T CAR+/CD8+; parte inferior: se muestra la intensidad de fluorescencia media de las células T CD8+ positivas para CAR;

Figura 17: Lisis celular tumoral específica mediada por diferentes mutantes de construcciones CLDN6-CAR-28 $\zeta$  con cisteína mutada 46. A) La expresión de la superficie de CLDN6 en estirpes celulares diana se analizó después de la tinción con un anticuerpo específico de CLDN6 conjugado con Alexa647 mediante citometría de flujo. B) Las células T CD8+ preactivadas se transfectaron con 20  $\mu$ g de ARN CAR y se cultivaron 20 h más tarde junto con células de estirpe de tumor (MDA-MB-231-Luc-Tomato) negativas CLDN6 o (PA1) positivas

para CLDN6 en diferentes proporciones E:T. La lisis específica se analizó mediante un ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa después de 4 h de cocultivo. C) La expresión de la superficie de CAR en las células T se analizó después de la tinción con un anticuerpo específico de CD8 conjugado con fluorocromo y un anticuerpo específico de idiотipo mediante citometría de flujo.

5 Figura 18: Lisis dependiente de la dosis de células diana mediadas por diferentes mutantes de construcciones CLDN6-CAR-28 $\zeta$  con cisteína mutada 46. A) Se transfectaron células T CD8<sup>+</sup> preactivadas con 20  $\mu$ g de ARN CAR y se cultivaron 20 h más tarde junto con iDC autólogo transfectado con cantidades tituladas de CLDN6-RNA (E: T = 30:1). B) La expresión de la superficie de CLDN6 en iDC transfectados se analizó después de la tinción con un anticuerpo específico de CLDN6 conjugado con Alexa647 mediante citometría de flujo.

10 Figura 19: Representación esquemática de la construcción retroviral SIN utilizada para la expresión estable de CAR. El plásmido pES12.6-CLDN6-CAR-C46S se usó para la generación transitoria del vector SIN envuelto en GALV utilizando células HEK293T.

Figura 20: Detección de CLDN6-CAR y CAR contra un antígeno tumoral no relacionado en células T humanas transducidas utilizadas para transferencia adoptiva en ratones NSG. Las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo (BD Biosciences) dirigidos contra CD8 y CD4, así como con anticuerpos específicos de idiотipo dirigidos contra la parte scFv respectiva del CLDN6-CAR (anti-IMAB206, Ganymed Pharmaceuticals AG) y la CAR contra un antígeno tumoral no relacionado, respectivamente. Las células se clasificaron en linfocitos CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>. Las células T transducidas se utilizaron para la transferencia de células adoptivas en ratones NSG con injerto de OV90-SC12. La tasa de transducción para el CLDN6-CAR y el CAR contra un antígeno tumoral no relacionado fue aproximadamente el 37% de CD4<sup>+</sup> y el 20% de CD8<sup>+</sup>, así como el 36% de CD4<sup>+</sup> y 24 de CD8<sup>+</sup> células, respectivamente. Los gráficos se muestran en escala logarítmica.

Figura 21: Actividad antitumoral de células T transducidas con CLDN6-CAR en un modelo de carcinoma de ovario. Se inyectaron  $1 \times 10^7$  células tumorales OV90-SC12 humanas (ATCC CRL11732) por vía subcutánea en ratones NSG (10 ratones/grupo). Después de 4 días, los ratones se trataron con una inyección intravenosa única de  $1 \times 10^7$  CD3/CD28 perlas estimuladas, células T humanas transducidas retrovíricamente (aproximadamente el 37% de CD4 y el 20% de CD8 eran CLDN6-CAR positivo). A) Esquema del montaje experimental. B) Retardo del crecimiento tumoral en ratones tratados con CLDN6-CAR en comparación con los grupos de control (sin células T, células T no transducidas y células T transducidas con CAR contra un antígeno tumoral no relacionado). La monitorización del tumor mediante mediciones de volumen y análisis de sangre periférica se realizó semanalmente. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio  $\pm$  SEM con n=10 ratones para todos los grupos. El volumen del tumor se calculó utilizando la siguiente fórmula:  $V=1/2 \times (\text{largo} \times \text{ancho cuadrado})$ . El gráfico para los ratones tratados con CLDN6-CAR es significativamente diferente del grupo de tratamiento de control para t=31 días (\*ANOVA, P<0.05). C) Se muestran las curvas de crecimiento tumoral de los ratones individuales de cada grupo. Tenga en cuenta que 2 ratones en el grupo de antígeno tumoral no relacionado tuvieron que sacrificarse el día 24 debido a la alta carga tumoral (marcada con +).

Figura 22. Proliferación de células CAR T después del co-cultivo con CLND6 que expresan iDC. Las células T CD8<sup>+</sup> se transfectaron con IVT-ARN que codifica una CAR dirigida contra A) CLDN6 o B) un antígeno tumoral no relacionado como control negativo, marcado con CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) y se cocultivaron con iDC autólogas transfectadas con CLDN6 durante 4 días. La proliferación de células CAR T se analizó en función de la dilución de CFSE por citometría de flujo. Las células se clasificaron en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vivos.

## EJEMPLOS

Las técnicas y métodos utilizados en este documento se describen en este documento o se llevan a cabo de una manera conocida per se y como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos los métodos, incluido el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante, a menos que se indique específicamente.

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

50 Estirpes celulares y reactivos

La estirpe celular de leucemia mieloide crónica humana K562 (Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B (1975), Blood 45, 321-334) se cultivó en condiciones estándar. Células K562 transfectadas de manera estable con HLA-A\*0201 (Britten, C. M. et al. (2002), J. Immunol. Methods 259, 95-110) (referidos, por ejemplo, como K562-A\*0201) se utilizaron para los ensayos de validación. La estirpe celular primaria de fibroblastos de prepucio de recién nacido humano CCD-1079Sk (ATCC No. CRL-2097) se cultivó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La estirpe celular de carcinoma de ovario que expresa CLDN6 humana OV-90-SC12 se usó para la validación in vivo de CLDN6-CAR.

El medio de cultivo para PA-1-SC12\_A0201\_luc\_gfp\_F7 está compuesto por 86% de RPMI 1640+ Glutamax (Co. Gibco, Cat. No. 61870), FCS al 10% (Co. Biochrome, Cat-No. S0615), Piruvato de sodio al 1% (100 mM) (Co. Gibco, No. de cat. 11360), solución de aminoácidos no esenciales MEM al 1% (100×) (Co. Gibco, núm. De cat. 11140), bicarbonato de sodio al 2% solución al 7.5% (Co. Gibco, Cat. No. 25080).

- 5 El medio de cultivo para OV-90-SC12 está compuesto por MCDDB 105 al 41.5% de (Co. Sigma Aldrich, Cat. No. M6395-1L), Medio 199 al 41.5% (Co. Sigma Aldrich, Cat. No. M2154-500 mL), FCS al 15% (Co. Biochrome, No. de catálogo S0615), bicarbonato de sodio al 2% solución al 7.5% (Co. Gibco, No. de catálogo 25080).

- 10 El medio de cultivo para SK-MEL-37 está compuesto por DMEM+ Glutamax (Co. Gibco, Cat-No. 31966) al 90%, FCS al 10% (Co. Biochrome, Cat-No. S0615). El medio de cultivo para MDA-MB-231\_luc\_tom está compuesto por RPMI 1640+ Glutamax (Co. Gibco, Cat. No. 61870) al 88%, FCS de (Co. Biochrome, No. de Cat. S0615) al 10%, Piruvato de sodio (100 mM) (Co. Gibco, No. de cat. 11360) al 1%, solución de aminoácidos no esenciales MEM al 1% (100×) (Co. Gibco, No. de cat. 11140).

La alimentación y/o división de las estirpes celulares se realizó cada 2 a 3 días.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC), monocitos y células dendríticas (DC)

- 15 Las PBMC se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) a partir de capas leucoplaquetaria. Los alelotipos de HLA se determinaron mediante métodos estándar de PCR. Los monocitos se enriquecieron con microperlas anti-CD14 (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Alemania). Las DC inmaduras (iDC) se obtuvieron mediante la diferenciación de monocitos durante 5 días en medio de cultivo suplementado con citoquinas, como se describe en Kreiter et al.
- 20 (2007), *Cáncer Immunol. Immunother.*, CII, 56, 1577-87.

Péptidos y pulsos de péptidos de las células estimuladoras

- 25 Los grupos de péptidos de 15 mer libres en el extremo N y C con 11 superposiciones de aminoácidos correspondientes a las secuencias de Claudina-6 o HIV-gag (denominado conjunto de péptidos antigénicos) se sintetizaron mediante la química de fase sólida estándar (JPT GmbH, Berlín, Alemania) y se disolvió en DMSO hasta una concentración final de 0,5 mg/ml. Los péptidos no polímeros se reconstituyeron en PBS 10% DMSO. Para estimulador de pulsos, las células se incubaron durante 1 hora a 37°C en medio de cultivo utilizando diferentes concentraciones de péptidos.

Vectores para la transcripción in vitro (IVT) de ARN

- 30 Todos los constructos son variantes del plásmido pST1-sec-insert-2βgUTR-A(120)-Sap1 descrito anteriormente (Holtkamp, S. et al. (2006), *Blood* 108, 4009-4017). Para obtener plásmidos que codifican cadenas de TCR humanas, se amplificó el ADNc que codifica las regiones constantes de TCR-α o TCR-β<sub>1</sub> y TCR-β<sub>2</sub> de las células T CD8+ humanas y se clonó en esta estructura principal. Para la generación de plásmidos que codifican cadenas de TCR murinos, los ADNc que codifican las regiones constantes de TCR-α, β<sub>1</sub> y β<sub>2</sub> se ordenaron de un proveedor comercial y se clonaron de manera análoga (números de acceso de GenBank M14506, M64239 y X67127, respectivamente). Los productos específicos de V(D)J PCR se introdujeron en dichos casetes para producir cadenas de TCR de longitud completa (denominadas pST1-TCRαβ-2βgUTR-A humano/murino (120)).
- 35

- 40 Análogamente, se insertaron alelos HLA de clase I y II clonados a partir de PBMC de donantes y cADN de beta-2-microglobulina (B2M) de DC humanas en este esqueleto (denominado pST1-HLA clase I/II-2βgUTR-A(120) y pST1-B2M-2βgUTR-A(120)).

- 45 Plásmidos que codifican el antígeno pp65 de CMV (pST1-sec-pp65-MITD-2βgUTR-A(120)) y NY-ESO-I (pST1-sec-NY-ESO-1-MITD-2βgUTR-A(120)) vinculados a una señal de secreción (seg) y la señal de tráfico MHC de clase I (MITD) se describieron anteriormente (Kreiter, S. et al. (2008), *J. Immunol.* 180, 309-318). PLAC1 que codifica el plásmido pST1-sec-PLAC1-MITD-2βgUTR-A(120) se generó clonando un ADNc obtenido de un proveedor comercial (número de acceso de GenBank NM 021796) en la estructura general Kreiter et al. Se generaron plásmidos pST1-αgUTR-TPTE-2βgUTR-A(120) y pST1-αgUTR-TPTE-MITD-2βgUTR-A(120) que codifican TPTE clonando un ADNc obtenido de un proveedor comercial (número de acceso de GenBank AF007118) en una variante del vector Holtkamp et al. que presenta una región no traducida 5' alfa-globina adicional.

- 50 Los cebadores se compraron de Operon Biotechnologies, Colonia, Alemania.

Generación de ARN transcrito in vitro (IVT) y transferencia a células

La generación de ARN de IVT se realizó como se describió anteriormente (Holtkamp, S. et al. (2006), *Blood* 108, 4009-4017) y se añadieron a las células suspendidas en medio X-VIVO 15 (Lonza, Basilea, Suiza) en una cubeta de electroporación estéril de 4 mm pre-enfriada (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). La

electroporación se realizó con un aparato Gene-Pulser-II (Bio-Rad Laboratories GmbH, Múnich, Alemania) (células T: 450 V/250  $\mu$ F; células T IVSB: 350 V/200  $\mu$ F; SupT1 (ATCC No. CRL-1942): 300 V/200  $\mu$ F; DC humano: 300 V/150  $\mu$ F; K562: 200 V/300  $\mu$ F).

Cebado in vivo de células T mediante inmunización intranodal de ratones HLA A2.1/DR1 con ARN de IVT

- 5 Células T de ratones A2/DR1 (Pajot A. et al. (2004), EUR. J. Immunol. 34, 3060-69) se cebaron in vivo contra el antígeno de interés mediante inmunización intranodal repetitiva utilizando el ARN de la IVT que codifica el antígeno (Kreiter S. y otros (2010), Cancer Research 70, 9031-40). Para las inmunizaciones intranodales, los ratones se anestesiaron con xilazina/ketamina. El ganglio linfático inguinal se expuso quirúrgicamente, se inyectaron lentamente 10  $\mu$ L de ARN (20  $\mu$ g) diluido en solución de Ringer y agua libre de ARNasa utilizando una jeringa de 0.3 ml de un solo uso con una aguja ultrafina (31 G, BD Biosciences), y la herida estaba cerrada. Después de seis ciclos de inmunización, los ratones se sacrificaron y se aislaron células de bazo.

Cosecha de células del bazo

- 15 Después de su disección en condiciones estériles, los bazos se transfirieron a tubos falcon que contenían PBS. Los bazos se rompieron mecánicamente con fórceps y las suspensiones celulares se obtuvieron con un filtro de células (40  $\mu$ m). Los esplenocitos se lavaron con PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en un tampón hipotónico para la lisis de los eritrocitos. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo agregando 20-30 ml de medio o PBS. Las células del bazo se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS.

Clasificación unicelular de células T CD8+ específicas de antígeno después de la tinción de CD137

- 20 Para la reestimulación específica de antígeno, se sembraron  $2.5 \times 10^6$  células de bazo de ratones inmunizados A2/DR1 en una placa de 24 pozos y se pulsaron con un conjunto de péptidos superpuestos que codifican el antígeno de interés o un antígeno de control. Después de 24 h, se recogieron las células de incubación, se tiñeron con un anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC, un anticuerpo anti-CD4 conjugado con PE, un anticuerpo anti-CD8 conjugado con PerCP-Cy5.5 y un anticuerpo anti-CD137 conjugado con Dylight-649. La clasificación se realizó en un citómetro de flujo Aria BD FACS (BD Biosciences). Las células positivas para CD137, CD3 y CD8 se clasificaron, se recogió una célula por pozo en una placa de fondo en V de 96 pozos (Greiner Bio-One) que contenía células CCD-1079SK humanas como células alimentadoras, se centrifugaron a 4°C y se almacenó inmediatamente a -80°C.

Extracción de ARN, síntesis de ADNc basada en SMART y amplificación inespecífica de células clasificadas

- 30 El ARN de las células T clasificadas se extrajo con el kit RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se utilizó un protocolo BD SMART modificado para la síntesis de ADNc: BD PowerScript Reverse Transcriptase (BD Clontech, Mountain View, California) se combinó con oligo (dT)-T- cebador largo para el cebado de la reacción de síntesis de la primera cadena y TS-corta (Eurogentec SA, Seraing, Bélgica) introduciendo una secuencia de oligo (riboG) para permitir la creación de una plantilla extendida por la actividad de la transferasa terminal de la transcriptasa inversa y para el cambio de plantilla (Matz, M. et al. (1999) Nucleic Acids Res. 27, 1558-1560). La primera cadena de ADNc sintetizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante se sometió a 21 ciclos de amplificación con 5 U de polimerasa de ADN PfuUltra Hotstart de alta fidelidad (Stratagene, La Jolla, CA) y 0.48  $\mu$ M de cebador TS-PCR en presencia de 200  $\mu$ M dNTP (condiciones de ciclado: 2 min a 95°C durante 30 min a 94°C, 30 min a 65°C, 1 min a 72°C, extensión final de 6 min a 72°C). La amplificación exitosa de los genes de TCR se controló con cebadores específicos de la región constante TCR- $\beta$  humana o murina y las PCR V $\alpha$ -/V $\beta$ -humana o murina consecutivas específicas del clonotipo solo se realizaron si se detectaron bandas fuertes.

- 45 La primera cadena de ADNc para la amplificación de secuencias HLA de clase I o II se sintetizó con SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen) y cebador Oligo (dT) con 1-5  $\mu$ g de ARN extraído de PBMC derivadas del paciente.

Diseño de cebadores de PCR para amplificación TCR y HLA

- 50 Para el diseño de cebadores de consenso TCR humanos, todos los 67 genes TCR-V $\beta$  y 54 TCR-V $\alpha$  (marcos de lectura abiertos y pseudogenes) se enumeran en la base de datos ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) junto con sus correspondientes secuencias líderes se alinearon con el Editor de Alineación de Secuencias de BioEdit (por ejemplo, <http://www.bio-soft.net>). Los cebadores directos de longitud de 24 a 27 pb con un máximo de 3 bases degeneradas, un contenido de GC entre 40-60% y un G o C en el extremo 3' se diseñaron para acoplarse a tantas secuencias líderes como sea posible y están equipados con un extensión de 15 pb 5' con un sitio de enzimas de restricción y una secuencia Kozak poco comunes. Los cebadores inversos se diseñaron para hibridar con los primeros exones de los genes de la región constante, con el cebador TRACex1a como las secuencias correspondientes a los aminoácidos 7 a 16 de Cu y TRBCex1as a los aminoácidos (aa) 8 a 16 en C $\beta$ 1 y C $\beta$ 2. Ambos oligonucleótidos se sintetizaron con un fosfato 5'. Los cebadores se agruparon en grupos de 2 a 5 oligos delanteros con temperatura de hibridación idéntica.

Esta estrategia se replicó para el diseño de cebadores de consenso TCR murinos, alineando 129 genes TCR-V $\alpha$  listados y 35 genes TCR-V $\beta$  listados. Los cebadores inversos mTRACex1\_as y mTRBCex1\_as son homólogos a las secuencias correspondientes a aa 24 a 31 y 8 a 15, respectivamente.

Los cebadores de consenso HLA se diseñaron alineando todas las secuencias HLA de clase I y II enumeradas en el sitio web del Instituto de Investigación Anthony Nolan ([www.anthonynolan.com](http://www.anthonynolan.com)) con el Editor de Alineación de Secuencias de BioEdit. Los cebadores directos de 23 a 27 pb de longitud con un máximo de 3 bases degeneradas pero que conservan el código que se hibridan a la mayor cantidad posible de secuencias HLA de un locus estaban equipados con una extensión de secuencia 5'-fosfato y Kozak. Los cebadores inversos se diseñaron de manera análoga, pero sin la introducción de bases oscilantes y se equiparon con una extensión 5' de 14 pb que codifica un sitio de enzima de restricción AsiSI.

#### Amplificación por PCR y clonación de secuencias V(D)J

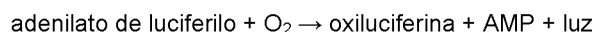
3-6  $\mu$ l de ADNc preamplificado de células T aisladas se sometieron a 40 ciclos de PCR en presencia de un grupo de oligos específico de V $\alpha$ -V $\beta$  0.6  $\mu$ M, oligo de C $\alpha$  o C $\beta$  de 0.6  $\mu$ M, dNTP 200  $\mu$ M y 5 U Pfu polimerasa (Condiciones de ciclado: 2 minutos a 95°C, 30 segundos a 94°C, temperatura de hibridación de 30 segundos, 1 minuto a 72°C, tiempo de extensión final de 6 minutos a 72°C). Los productos de PCR se analizaron utilizando el sistema de electroforesis capilar de Qiagen. Las muestras con bandas a 400-500 pb se fraccionaron por tamaños en geles de agarosa, las bandas se escindieron y se purificaron usando un kit de extracción de gel (Qiagen, Hilden, Alemania). Se realizó un análisis de secuencia para revelar la secuencia del dominio V(D)J y la región constante  $\beta$ , como cebador TRBCex1\_as y mTRBCex1\_as, respectivamente, coinciden con los genes de región constante TCR  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 en humanos y ratones, respectivamente. El ADN se digirió y se clonó en los vectores de IVT que contenían la estructura principal apropiada para una cadena TCR- $\alpha/\beta$  completa.

#### Análisis de citometría de flujo

La expresión en la superficie celular de los genes TCR transfectados se analizó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-TCR conjugado con PE contra la familia de la región variable apropiada o la región constante de la cadena  $\beta$  de TCR (Beckman Coulter Inc., Fullerton, E.U.A.) y FITC-/APC marcados con anticuerpos anti-CD8-/CD4 (BD Biosciences). La expresión en la superficie celular de las CAR transfectadas se analizó utilizando un anticuerpo específico de idiotipo conjugado con Dylight-650 (Ganymed Pharmaceuticals) que reconoce el fragmento scFv contenido en todas las construcciones de CLDN6-CAR. Los antígenos HLA se detectaron mediante tinción con HLA marcada con FITC específica de clase II (Beckman Coulter Inc., Fullerton, E.U.A.) y anticuerpos específicos de HLA clase I marcados con PE (BD Biosciences). La expresión de superficie de CLDN6 en células diana se analizó mediante tinción con un anticuerpo específico de CLDN6 conjugado con Alexa-Fluor647 (Ganymed Pharmaceuticals). El análisis de citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FACS CANTO II utilizando el software FACS Diva (BD Biosciences).

#### Ensayo de citotoxicidad de la luciferasa

Para la evaluación de la citotoxicidad mediada por células, se estableció un ensayo basado en bioluminiscencia como una alternativa y optimización a la liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . En contraste con el ensayo estándar de liberación de cromo, este ensayo mide la actividad lítica de las células efectoras calculando el número de células diana que expresan luciferasa viable después de la coincubación. Las células diana se transfectaron de manera estable o transitoria con el gen de luciferasa que codifica la luciferasa de luciérnaga de la luciérnaga Photinus pyralis (EC 1.13.12.7). La luciferasa es una enzima que cataliza la oxidación de la luciferina. La reacción es dependiente de ATP y tiene lugar en dos pasos:



Las células diana se colocaron en placas a una concentración de  $10^4$  células por pozo en placas blancas de 96 pozos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) y se cultivaron con números variables de células T transfectadas con TCR en un volumen final de 100  $\mu$ l. 3 h más tarde 50  $\mu$ l de una mezcla de reacción que contiene D-Luciferina (BD Biosciences) (Luciferina (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), tampón HEPES (50 mM, pH), Adenosina 5'-trifosfatasa (ATPasa, 0.4 mU/ $\mu$ l, Sigma -Aldrich, St. Louis, E.U.A.) Se añadió a las células. Mediante la adición de ATPasa a la mezcla de reacción, la luminiscencia resultante de la luciferasa liberada de las células muertas disminuyó.

Después de un tiempo total de incubación de 4 h, se midió la bioluminiscencia emitida por células viables utilizando el lector Tecan Infinite 200 (Tecan, Crailsheim, Alemania). La actividad de muerte celular se calculó con respecto a los valores de luminiscencia obtenidos después de la lisis celular completa inducida por la adición de Triton-X 100 al 2% y en relación con la luminiscencia emitida por las células diana solas. La salida de datos se realizó en recuentos por segundo (CPS) y el porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera:

$$(1 - (\text{CPS}_{\text{exp}} - \text{CPS}_{\text{min}})/(\text{CPS}_{\text{max}} - \text{CPS}_{\text{min}})) * 100.$$



La luminiscencia máxima (recuentos máximos por segundo, CPSmax) se evaluó después de incubar las células diana sin efectores y se evaluó la luminiscencia mínima (CPSmin) después del tratamiento de las dianas con el detergente Triton-X-100 para la lisis completa.

ELISPOT (ensayo ImmunoSPOT ligado a enzimas)

- 5 Las placas de microtitulación (Millipore, Bedford, Mass., E.U.A.) Se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IFN $\gamma$  1-D1k (Mabtech, Estocolmo, Suecia) y se bloquearon con 2% de albúmina humana (CSL Behring, Marburg, Alemania). Se colocaron células estimulantes presentadoras de antígeno de  $2.5 \times 10^4$ /pozo por triplicado junto con  $0.3-3 \times 10^5$ /pozo. Las células efectoras CD4+ o CD8+ transfectadas con TCR 24 h después de la electroporación.
- 10 Las placas se incubaron durante la noche (37°C, 5% de CO $_2$ ), se lavaron con PBS al 0,05% de Tween 20 y se incubaron durante 2 horas con el mAB 7-B6-1 biotinilado anti-IFN $\gamma$  (Mabtech) a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml a 37°C. Se añadió a los pozos peroxidasa de rábano picante unida a la avidina H (Vectastain Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, E.U.A.), se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se desarrolló con 3-amino-9-etil carbazol (Sigma, Deisenhofen, Alemania).
- 15 Ensayo de proliferación de CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína)  
  
Las células T CD8+ se transfectaron con TCR o ARN CAR y se etiquetaron con CFSE 2.5  $\mu$ M. Las células T etiquetaron se lavaron y se cultivaron con monocitos autólogos transfectados con ARN o iDC (E:T (células efectoras: células diana (tumores) = 10:1). Después de 4 días de cocultivo, se recolectaron las células y se analizó la proliferación mediante citometría de flujo en función de la reducción progresiva a la mitad de la fluorescencia de CFSE en células hijas después de las divisiones celulares.
- 20

Construcción retroviral para la expresión estable de CAR

Para la expresión estable de CLDN6-CAR o CAR contra un antígeno tumoral no relacionado utilizado como control negativo, se usó el vector SIN 12.6 retrovírico (Figura 19).

Transducción de células T humanas

- 25 Para los experimentos de transferencia de células adoptiva (ACT) en ratones, los linfocitos T humanos se enriquecieron de PBMC de donantes sanos mediante la eliminación de monocitos después de 2 h de adherencia plástica. Los linfocitos T se cultivaron en medio X-Vivo15 (Lonza) suplementado con suero humano al 5% (Invitrogen), 100 U/ml de IL2 (Proleukin S, Novartis), 20 ng/ml de IL7 (Miltenyi), 10 ng/ml de IL15 (Miltenyi) y estimulado con perlas magnéticas anti-CD3/anti-CD28 (Dynabeads; Invitrogen) en una proporción de 1:3 de células CD3 a perla y transducido en los días 3 y 4 después de la estimulación con sobrenadantes retrovirales. Las células se expandieron en medio X-Vivo15 complementado con suero humano AB al 5%, 300 U/ml de IL2, 20 ng/ml de IL7 y 10 ng/ml de IL15. Incubación a 37°C, CO $_2$  5% de, 95% de rH (Figura 20).
- 30

Modelo de ratón para la validación in vivo de la actividad antitumoral

- 35 Los tumores de xenoinjerto se establecieron mediante inyección subcutánea de  $1 \times 10^7$  OV90-SC12 en células tumorales de ovario humano en ratones NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) de 8-14 semanas de edad (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me). Después de 4 días, los ratones se trataron con una inyección intravenosa única de  $1 \times 10^7$  de células T transducidas con CAR (20-37% de CAR positivo). El monitoreo del tumor se realizó semanalmente mediante mediciones de volumen utilizando un calibrador (Figura 21 (a)).

- 40 **Ejemplo 2:** Aislamiento de TCR murinos restringidos por HLA-A\*02 de alta afinidad específicos para la claudina-6

- Validamos el potencial inmunogénico de CLDN6 en ratones A2/DR1 mediante inmunización intranodal repetitiva con CLDN6 que codifica IVT-RNA y utilizamos células de bazo de estos ratones para el aislamiento de células T específicas de CLDN6 y la posterior clonación de los genes de TCR correspondientes (figura 5). Se analizaron células de bazo de ratones inmunizados para determinar la inducción exitosa de células T específicas de CLDN6 y su reactividad frente a péptidos CLDN6 de unión a HLA-A\*02 predichos ex vivo mediante el ensayo IFN $\gamma$ -ELISPOT (Figura 6).
- 45

Frecuencias significativas de células T específicas de CLDN6 podrían inducirse en los tres ratones mediante inmunización con ARN, mientras que la reactividad de las células T se centró en dos péptidos CLDN6 predichos, que estaban con la mejor puntuación de unión HLA-A\*02 (C16-A2-1 y C16-A2-2).

- 50 Para el aislamiento de células T específicas de CLDN6, las células de bazo de ratones inmunizados se reestimularon in vitro y se clasificaron mediante citometría de flujo en función de la regulación positiva de CD137 inducida por activación (Figura 7).

Las células T CD8<sup>+</sup> específicas de CLDN6 se pudieron recuperar de los tres ratones A2/DR1 inmunizados y se clonó un total de 11 TCR específicos de CLDN6 a partir de células T murinas clasificadas por separado.

Los TCR se sometieron a ensayos de validación inmunológica, que revelaron que seis CLDN6-TCR reconocieron el epítipo CLDN6-91-99 restringido a HLA-A\*0201 (CI6-A2-1) y cuatro CLDN6-TCR eran específicos para CLDN6-14-22 (CI6-A2-2), mientras que ambos epítopos se identificaron previamente mediante análisis ELISPOT ex vivo (Figura 8). Un CLDN6-TCR (TCRCD8-CLDN6#7) reconoció el péptido CLDN6-7-15 (CI6-A2-3).

### **Ejemplo 3:** Pruebas comparativas de TCR murinos específicos para CLDN6 91-99

En total, se identificaron seis TCR murinos que reconocen el epítipo restringido HLA-A\*02 CLDN6-91-99. Con el fin de confirmar que este epítipo se procesa de forma natural y se presenta mediante estirpes de células tumorales que expresan CLDN6 de manera endógena y para evaluar el potencial de los TCR murinos identificados para mediar la muerte de dichas células, se realizó un ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa. Las células T CD8<sup>+</sup> preactivadas humanas se transfectaron con ARN de TCR y la expresión de la superficie se analizó mediante citometría de flujo (Figura 9). Todos los TCR murinos se expresaron en un alto porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> humanas después de la transferencia de ARN como se indica mediante tinción con un anticuerpo conjugado con fluorocromo específico para el dominio constante de la cadena TCR- $\beta$  murina. Las células T transfectadas con TCR se sometieron a un ensayo de citotoxicidad basada en luciferasa junto con las estirpes de células tumorales que expresan CLDN6 PA1 (teratoma) y NIH-Ovar3 (carcinoma de ovario). La estirpe celular de cáncer de mama CLND6 negativa MDA-MB-231 sirvió como control negativo. Todos los TCR mediaron la lisis eficiente de las estirpes celulares tumorales que expresan CLDN6 que van desde 38-94% de PA1 y 29-76% de NIH-Ovar3, mientras que no se pudo observar lisis con células T no transfectadas (Figura 10). La mayoría de las células diana se lisaron cuando se usó el mTCR<sub>CD8</sub>-CLDN6# 1, #8 o #18.

Con el fin de analizar, si los TCR murinos pueden mediar la proliferación específica de células T humanas después del cocultivo con células diana autólogas que expresan antígeno, se realizó un ensayo de proliferación de CFSE (Figura 11). Las células T CD8<sup>+</sup> transfectadas con TCR se cocultivaron con monocitos autólogos transfectados con cantidades tituladas de ARN de CLDN6. Todos los TCR mediaron la proliferación específica indicada por la dilución del colorante de proliferación CFSE después de 4 días de cocultivo con células CD14<sup>+</sup> transfectadas con ARN CLDN6, mientras que de nuevo mTCR<sub>CD8</sub>-CLDN6# 1, #8 o #18 mostraron los mejores resultados, especialmente cuando las cantidades son bajas de ARN de CLDN6 se transfectaron en las células diana. Decidimos utilizar mTCR<sub>CD8</sub>-CLDN6 #18 como un estándar de oro para la selección de la estructura del cable junto con CLDN6 que tiene como objetivo los formatos de CAR.

### **Ejemplo 4:** Generación y Validación In Vitro de CAR específicos de Claudina-6

Evaluamos dos formatos diferentes de CAR para apuntar específicamente a CLDN6 en CLDN6 expresando células diana. Uno de ellos representa un formato nuevo basado en el enlace del scFv con el dominio constante de la cadena TCR $\beta$  murina y la coexpresión del dominio constante de la cadena TCR $\alpha$  (CAR/C $\alpha$ ) (Voss RH et al., (2011) Molecular Therapy 19, suplemento, S86) (figura 3). El segundo formato representa un CAR clásico de segunda generación (CAR-28 $\zeta$ ) que contiene las fracciones de señalización y coestimulación de CD3 $\zeta$  y CD28, respectivamente. Una eliminación de la fracción de unión a lck en el endodominio CD28 anula la secreción de IL2 en CAREngagement para prevenir la inducción de células T reguladoras (Kofler D. M. et al., (2011) Molecular Therapy 19 (4), 760-767). Una modificación del dominio 'separador' Fc de IgG1 en la fracción extracelular de la CAR evita la activación 'fuera del objetivo' y el inicio involuntario de una respuesta inmunitaria innata (Hombach A. et al., (2010) Gene Therapy 17, 1206-1213).

Dado que los CAR proporcionan una unión a antígeno mediada por scFv independiente de HLA, son funcionales tanto en las células T CD4<sup>+</sup> como en las células CD8<sup>+</sup>. Por lo tanto, primero analizamos la expresión superficial de CAR en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> después de la transfección de ARN CAR en PBMC en volumen.

Ambos, el CAR/C $\alpha$  nuevo y el CAR clásico de segunda generación (CAR-28 $\zeta$ ) se expresan en la superficie de las células T humanas después de la transferencia de ARN (Figura 12). El CAR-28 $\zeta$  se expresó significativamente mejor en la superficie de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que el CAR/C $\alpha$ . El último se transfirió mediante cotransfección de CAR y la cadena C $\alpha$  o como un vector bicistrónico basado en péptidos 2 A para la expresión simultánea de los genes CAR y C $\alpha$ . El análisis de citometría de flujo demostró que el enlace basado en 2A de CAR y C $\alpha$  da como resultado una expresión de superficie disminuida en comparación con la coexpresión de los dos componentes. Como un vector bicistrónico se usaría para pruebas clínicas, el enlace de los dos componentes CAR/C $\alpha$  debe mejorarse aún más.

Para analizar la lisis celular tumoral específica mediada por los diferentes formatos de receptores dirigidos a CLDN6, se realizó un ensayo de citotoxicidad basado en luciferasa. Las células T CD8<sup>+</sup> preactivadas

transfectadas con CAR o TCR se cultivaron con estirpes de células tumorales positivas o negativas para CLDN6 en diferentes relaciones efector a diana y la lisis específica se calculó después de 4 h de cocultivo (Figura 13).

Todas las células T transfectadas con CAR y TCR demostraron una lisis específica significativa de estirpes de células tumorales que expresan CLDN6 en comparación con las células T no transfectadas.

- 5 Un requisito previo para la proliferación y persistencia de las células T diseñadas por CAR en el paciente es la presencia de antígeno como lo demuestran los resultados prometedores de ensayos clínicos de CAR específicos para CD19 en tumores malignos hematológicos. En analogía con la expansión de las células T endógenas mediante la inmunización con ARN, quisimos analizar si las células T CAR también podrían expandirse utilizando la vacunación con ARN de células diana para proporcionar CLDN6 natural para la estimulación de las células T CAR. Se realizó un ensayo de proliferación in vitro utilizando células T CD8+ transfectadas con CAR junto con CLDN6 o iDC autólogas transfectadas con ARN de control (Figura 14). El mTCR<sub>CD8</sub>-CLDN6 #18 medió la mejor proliferación en respuesta a las células diana transfectadas con CLDN6 (73%). El CLDN6-CAR-28 también resultó en una proporción significativa de células T en proliferación (44%), mientras que el CLDN6-CAR/Ca no logró inducir la proliferación, probablemente debido a la falta de estimulación mediada por CD28. Como la inducción de la proliferación es un requisito previo para el éxito de la actividad antitumoral, decidimos usar el formato CAR-28ζ para una mayor selección de la estructura líder.

#### **Ejemplo 5:** Selección de la estructura líder CLDN6-CAR-28ζ para pruebas preclínicas y clínicas

- 20 El fragmento scFV de CLDN6-CAR-28ζ que es responsable del reconocimiento de antígenos contiene una cisteína no pareada. Como tal la cisteína libre podría resultar en un plegado incorrecto de la proteína CAR en ciertas circunstancias o en interacciones no deseadas con otras cisteínas por la formación de enlaces disulfuro, decidimos eliminar esta cisteína y la intercambiamos por una serina, una glicina o una alanina.

- 25 A continuación, analizamos comparativamente las construcciones de CLDN6-CAR-28ζ resultantes con respecto a la expresión de la superficie (Fig. 15, 16) y la citotoxicidad (Fig. 17). Excepto en la variante de glicina, todas las construcciones mutadas demostraron una expresión en la superficie y una lisis comparable a la variante de tipo silvestre.

- 30 Con el fin de comparar la afinidad de las construcciones de CAR mutadas, se analizó su potencial citotóxico en respuesta a los iDC autólogos transfectados con cantidades tituladas de ARN de CLDN6. Incluso cantidades extremadamente pequeñas de ARN de CLDN6 (0.001 μg) dieron como resultado una lisis significativa de las células diana mediadas por todas las construcciones CAR. Como la variante de serina del CLDN6-CAR-28ζ mostró resultados ligeramente mejores con respecto a la expresión de la superficie y la citotoxicidad, decidimos utilizar esta variante para las pruebas preclínicas.

#### **Ejemplo 6:** Actividad antitumoral in vivo del CLDN6-CAR

- 35 Después de haber determinado la actividad antitumoral contra CLDN6 que expresan estirpes celulares tumorales in vitro, se determinó la capacidad antitumoral en ratones portadores de tumores. Por lo tanto, la potencia de las células T humanas transducidas con CLDN6-CAR se comparó con las células T transducidas con un control CAR contra un antígeno tumoral no relacionado y las células T no transducidas en un modelo de xenoinjerto. Un total de  $1 \times 10^7$  células de la estirpe celular de carcinoma de ovario humano OV90-SC12 se inyectaron por vía subcutánea en ratones NSG. Cuatro días después del injerto tumoral, los ratones se trataron con una inyección intravenosa única de  $1 \times 10^7$  de células T transducidas con CAR. La monitorización del tumor se realizó semanalmente mediante mediciones de volumen utilizando un calibrador. El tratamiento de los ratones con células T transducidas con CLDN6-CAR redujo significativamente el crecimiento del tumor en comparación con los grupos de control tratados con células T no transducidas transducidas con el antígeno-tumor no relacionado o un grupo que no recibe células T (Figuras 21 (b) y (c)).

#### **Ejemplo 7:** Proliferación in vitro de células T CLDN6-CAR en respuesta a células objetivo que expresan CLDN6

- 45 En analogía a la expansión de las células T endógenas por inmunización con ARN, la estimulación y expansión de las células T CAR usando la vacunación con ARN de células diana para proporcionar CLDN6 natural se analizó mediante un ensayo de proliferación in vitro. Las células T CD8+ se transfectaron con IVT-ARN que codifica una CAR contra CLDN6 o un antígeno tumoral no relacionado como control negativo, se etiquetaron con CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) y se cocultivaron con iDC autólogas transfectadas con CLDN6 durante 4 días (figura 22). Se pudo observar la proliferación mediada por CLDN6-CAR de casi todas las células T CD8+ en respuesta al iDC transfectado con CLDN6 (95%), mientras que solo se pudo observar una proliferación de fondo (1.5%) para las células T transfectadas con antígeno tumoral no relacionado lo que indica que la proliferación no dependía de la estructura principal CAR, sino que era específica de CLDN6.

Epítomos de células T específicos de CLDN6

A2-1 (aa 91-99)

ALFGLLVYL

A2-2 (aa 14-22)

TLLGWVNGL

A2-3 (7-15)

5 QILGVVLT

Receptores de células T específicos de CLDN6

TCR<sub>CD8</sub>-mCl6#1:

SEQ ID NO: 6; > Vα9N.3 J13 C

MLLALLSVLGIHFLLRDAQAQSVPDARVTVSEGLQLRCKYSYFGTPYLFWYVQY  
PRQGLQLLLKYYPGDPVVQGVNGFEAEFSKSNSSFHLRKASVHWSDWAVYFCVSMSS  
GTYQRFGTGTLQVVPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFI  
TDKTVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETD  
MNLNFQNLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

10 SEQ ID NO: 7; > Vβ29 D1 J2.5 C2

MRVRLISAVVLCFLGTGLVDMKVTQMPRYLIKRMGENVLLECGQDMSHETMYWYRQ  
DPGLGLQLIYISYDSDSNSEGDIPKGYRVSRRKREHFSLLDSAKTNQTSVYFCASSSQN  
DTQYFGPGTRLLVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW  
WVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWHNPNNHFRQVQFHGLSEED  
KWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGL  
VLMAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mCl6#2:

SEQ ID NO: 8; > Vα6N.6 J23 C

MDSFPGFVAVILLILGRTHGDSVTQTEGQVTVSESKSLIINCTYSATSIGYPNLFWYVRYP  
GEGQLQLLKVITAGQKGSSRGFEATYNKEATSFHLQKASVQESDSAVYYCALNNQGKLI  
FGQGTKLSIKPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVL  
DMKAMDSKSNAGIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQ  
NLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

15 SEQ ID NO: 9; > Vβ13.2 D1 J2.4 C2

MGSRLFFVLSSLLCSKHMEAAVTQSPRNKVAVTGGKVTLSNQTNNHNNMYWYRQDT  
GHGLRLIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGGDSQN  
TLYFGAGTRLSVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWW  
VNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFWHNPNNHFRQVQFHGLSEEDK  
WPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLV  
MAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mCl6#3:

SEQ ID NO: 18; > Vα16N J6 C

MLILSLLGAAFGSICFAATSMAQKVTQTQTSISVVEKTTVTMDCVYETRDSSYFLFWYK  
QTASGEIVFLIRQDSYKKENATVGHYSLNFQPKSSIGLIITATQIEDSAVYFCAMRDSSG  
GNYKPTFGKGTSLVVHPYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTF  
ITDKTVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFET  
DMNLNFQNLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

20

SEQ ID NO: 19; > Vβ2 D2 J2.4 C2

MGSIFLSCLAVCLLVAGPVPDKIIQPKYLVAVTGSEKILICEQYLGHNAMYWYRQSAK  
KPLEFMFSYSYQKLMNDQTASSRFQPQSSKKNHLDLQITALKPDDSATYFCASSQEDWG  
SQNTLYFGAGTRLSVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS  
WWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFVHNPRNHFRCQVQFHGLSE  
EDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV  
GLVLMAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#7:

SEQ ID NO: 28; > Vα6N.7 o Vα6D.7\_4 J26 C

MDSFPGFMTVMILLIFTRAHGDSVTQTEGQVASEEDFLTIHCNYSASGYPALFWYVQYP  
GEGPQFLFRASRDKEKGSSRGFEATYDKGTTSFHLRKASVQESDSAVYYCALGNYYAQ  
GLTFGLGTRVSVFPYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDK  
TVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

5 SEQ ID NO: 29; > Vβ13.3 D1 J1.4\_02 C1

MGSRLFFVVLILLCAKHMEAAVTQSPRSKVAVTGGKVTLSCHQTNNDYMYWYRQDT  
GHGLRLIHYSYVADSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELASLSQTAVYFCASSTGNERL  
FFGHGTKLSVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVN  
GKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFVHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWP  
EGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLV  
AMVKKRNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#8:

SEQ ID NO: 10; > Vα16N J13 C

MLILSLLGAAFGSICFATSMQKVTTQTTSISVVEKTTVTMDCVYETRDSSYFLFWYKQ  
TASGEIVFLIRQDSYKKNATVGHYSNLFQKPKSSIGLIITATQIEDSAVYFCAMREAANS  
GTYQRFGTGTLQVVPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFI  
TDKTVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETD  
MNLNFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

10 SEQ ID NO: 11; > Vβ2 D1 J1.3 C1

MGSIFLSCLAVCLLVAGPVPDKIIQPKYLVAVTGSEKILICEQYLGHNAMYWYRQSAK  
KPLEFMFSYSYQKLMNDQTASSRFQPQSSKKNHLDLQITALKPDDSATYFCASSQNSG  
NTLYFGEGSRLIVVEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW  
WVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAFVHNPRNHFRCQVQFHGLSEED  
KWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLV  
VMAMVKKRNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#10:

SEQ ID NO: 20; > Vα13D.4\_03 J42 C

MKRLVCSLLGLLCTQVCWVKGQQVQQSPASLVLQEGENAELQCNFSSTATRLQWIFYQ  
RPGGSLVSLLYNPSTGKHTGRLTSTVTKERSSLISSQTTDSTGYFCAMSSNSGGSN  
AKLTFGKGTCLSVKSNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFIT  
DKTVLDMKAMDSSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETD  
MNLNFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

15

SEQ ID NO: 21; > Vβ4\_02 D2 J2.7 C2

MGCRLLSQVAFCLLGIGPLETAVFQTPNYRVTRVGNEVSFNCEQTLDHNTMYWYKQDS  
KKLLKIMFSYNNKQLIVNETVPRRFSPQSSDKAHLNLRKSVELEDSAVYLCASSDWGDS  
YEQYFGPGTRTLTVLEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW  
WVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEED  
KWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGL  
VLMAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#12:

SEQ ID NO: 12; > Vα3.3 J50 C

MKTVTGPLFLCFWLQNCVSRGEQVEQRPPHLSVREGDSAVITCTYTDPNSSYYFFWYK  
QEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFTVLLNKKDKRLSLNLTAHPGDSAAVFCAVESSS  
PSKLTVFGQGTSLSVVPNIQNPEPAVYQLKDPQSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFIT  
DKTVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETD  
MNLNLFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 13; > Vβ26 D2 J2.5 C2

MATRLLCYTVLCLLGARILNSKVIQTPLYLVKGQGGQKAKMRCIPEKGHPVVFYQQNK  
NNEFKFLINFQNGEVLQQIDMTEKRFSAECPNSPCSLIQSSEAGDSALYLCASSLTGGA  
QDTQYFGPGTRLLVLEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS  
WWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSE  
EDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV  
GLVLMAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#13:

SEQ ID NO: 22; > Vα16N J22 C

MLILSLLGAAFSGICFAATSMQKVTQTQTSISVVEKTTVTMDCVYETRDSSYFLFWYK  
QTASGEIVFLIRQDSYKKENATVGHYSLNFQKPKSSIGLIITATQIEDSAVYFCAMRVASS  
GSWQLIFGSGTQLTVMPDIQNPEPAVYQLKDPQSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTF  
ITDKTVLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFET  
DMNLNLFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 23; > Vβ2 D1 J2.1 C2

MGSIFLSCLAVCLLVAGPVPKHIQKPKYLVAVTGSEKILICEQYLGHNAMYWYRQSAK  
KPLEFMFSYSYQKLMDNQTASSRFQPSKKKNNHLDLQITALKPDDSATYFCASSQGDNN  
YAEQFFGPGTRTLTVLEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS  
WWWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSE  
EDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV  
GLVLMAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#14:

SEQ ID NO: 14; > Vα4N.4 o Vα4D.4\_03 J6 C

MQRNLVAVLGILWVQICWVRGDQVEQSPSALSLHEGTGSALRCNFTTTMRAVQWFRK  
NSRGSNLNLFYLASGTKENGRLKSAFDSKERYSTLHIRDAQLEDSTGYFCAAEAGGNYK  
PTFGKGTSLVHPYIQNPEPAVYQLKDPQSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKT  
VLDMKAMDSKSNAGIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNL  
NFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 15; > Vβ31 D1 J1.1 C1

MLYSLLAFLLLGMFLGVSAQTIHQWPVAEIKAVGSPLSLGCTIKGKSSPNLYWYWQATG  
GTLQQLFYSITVGQVESVVQLNLSASRPKDDQFILSTEKLLLSHSGFYLCWSPPINTEVF  
FGKGTRLTVVEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVN  
GKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWP  
EGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVM  
AMVKRKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#15:

SEQ ID NO: 24; > Va3.1 J39 C

MKTVTGPLLLLCFWLQLNCVSRGEQVEQRPPHLSVREGDSAIHICTYTDSATAYFSWYKQ  
EAGAGLQLMSVLSNVDRKEEQGLTVLLNKKDKRLSLNLTAHPGDSAVYFCATNAG  
AKLTFGGGTRLTVRPDIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFIT  
DKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETD  
MNLNFQNL SVMGLRILLK VAGFNLLMTLRLWSS

5

SEQ ID NO: 25; > Vβ4 D2 J2.7 C2

MGCRLLSCVAFCLLGIGPLETAVFQTPNYHVTQVGNEVSFNCKQTLGHDTMYWYKQD  
SKKLLKIMFSYNNKQLIVNETVPRRFSPQSSDKAHLNLRIKSVEPEDSAVYLCASSLYWG  
DSYEQYFGPGTRLTVLEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS  
WWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSE  
EDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV  
GLVLMAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#17:

10 SEQ ID NO: 26; > Va14.3 o Va14D.3/DV8\_08 J22 C

MDKNLTASFLLLGLHLAGVSGQQEKRDQQQVRQSPQSLTVWEGETAILNCSYENSADF  
YFPWYQQFPGEALLISILSVSDKKEDGRFTIFFNKREKKLSLHIADSQPGDSATYFCAA  
SLSSGSWQLIFGSGTQLTVMPDIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM  
SGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEK  
SFETDMNLNFQNL SVMGLRILLK VAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 27; > Vβ3 D2 J2.7 C2

MDIWLLGWIFSFLEAGHTGPKVLQIPSHQHDMGQMVTNLCDPVSNNHLYFYWYKQILG  
QQMEFLVNFYNGKVMESKLFKDQFSVERPDGSYFTLKIQPTALEDSAVYFCASSLVGG  
YEQYFGPGTRLTVLEDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW  
WVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEED  
KWPEGSPKPVTONISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSG  
VLMAMVKKKNS

TCR<sub>CD8</sub>-mC16#18:

15 SEQ ID NO: 16; > Va6D.6\_02 J4 C

MDSSPGFVAVILLILGRTHGDSVTQTEGPVTVSESESLINCTYSATSIAYPNLFWYVRY  
GEGQLLLKVITAGQKGSSRGFEATYNKETTSFHLQKASVQESDSAVYYCALGETGSFN  
KLTFGAGTRLAVCPYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITD  
KTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDM  
NLNFQNL SVMGLRILLK VAGFNLLMTLRLWSS

## ES 2 982 838 T3

SEQ ID NO: 17; > Vβ26 D1 J2.7 C2

MATRLLCYTVLCLLGARILNSKVIQTPRYL VKGQGQKAKMRCIPEKGHPVVFVWYQQNK  
NNEFKFLINFQNQEVLQQIDMTEKRFS AECPSNSPCSLEIQSSEAGDSALYLCASSLGIYE  
QYFGPGTRLTVLEDLRNVTTPPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWV  
NGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRV SATFWHNPRNHFR CQVQFHGLSEEDKW  
PEGSPKPV TQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLVLM  
AMVKKKNS



## REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico para uso en un método de terapia, comprendiendo dicho ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor artificial de células T que se une específicamente a claudina-6 (CLDN6),  
 5 en el que dicho receptor artificial de células T comprende un dominio de unión para CLDN6, un dominio transmembrana y un dominio de señalización de células T, en el que el dominio de señalización de células T comprende el endodominio de CD3-zeta, opcionalmente en combinación con CD28, y en el que dicho método comprende expresar dicho receptor artificial de células T en células T de un paciente con cáncer, en el que la unión de dicho receptor artificial de células T, cuando se expresa por células T, a CLDN6 presente en células cancerosas da como resultado la proliferación y activación de las células T.
- 10 2. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de una cadena pesada de anticuerpo (VH), comprendiendo dicha VH una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, 32, 34 y 36, o un fragmento de las mismas que comprende una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicha VH, preferiblemente al menos la CDR3 de dicha VH.
- 15 3. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio de unión para CLDN6 comprende una región variable de una cadena ligera de anticuerpo (VL), comprendiendo dicha VL una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 38 y 39, o un fragmento de las mismas que comprende una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicha VL.
- 20 4. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dominio de unión para CLDN6 comprende una combinación de VH y VL seleccionada de las siguientes posibilidades (i) a (vii):  
 (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31,  
 25 (ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33,  
 (iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 35,  
 (iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 36 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 37,  
 30 (v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31,  
 (vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38, y  
 35 (vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39.
5. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el receptor artificial de células T comprende un dominio de coestimulación que es un dominio de coestimulación seleccionado de CD28, CD137 (4-1BB), CD124 (OX40) y CD278 (ICOS).
- 40 6. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el receptor artificial de células T comprende la estructura:  
 NH<sub>2</sub> - péptido señal - dominio de unión para CLDN6 - región espaciadora - dominio transmembrana - dominio de señalización de células T - COOH.
- 45 7. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la terapia es el tratamiento de una enfermedad cancerosa caracterizada por células cancerosas que expresan CLDN6.
- 50 8. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho cáncer es cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula paratiroidea, cáncer de glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de

células renales, carcinoma de pelvis renal, neoplasias de el sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma hipofisario.

9. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho método comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula huésped del paciente.

- 5 10. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho método comprende una etapa de administrar al paciente el ácido nucleico que codifica el receptor artificial de células T o una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico.

11. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el ácido nucleico es ADN o ARN.

- 10 12. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ácido nucleico está desnudo, empaquetado en un liposoma o en una partícula de virus.

13. El ácido nucleico para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ácido nucleico es un sistema de base viral seleccionado del grupo que consiste en  $\gamma$ -retrovirus y lentivirus.

Figura 1

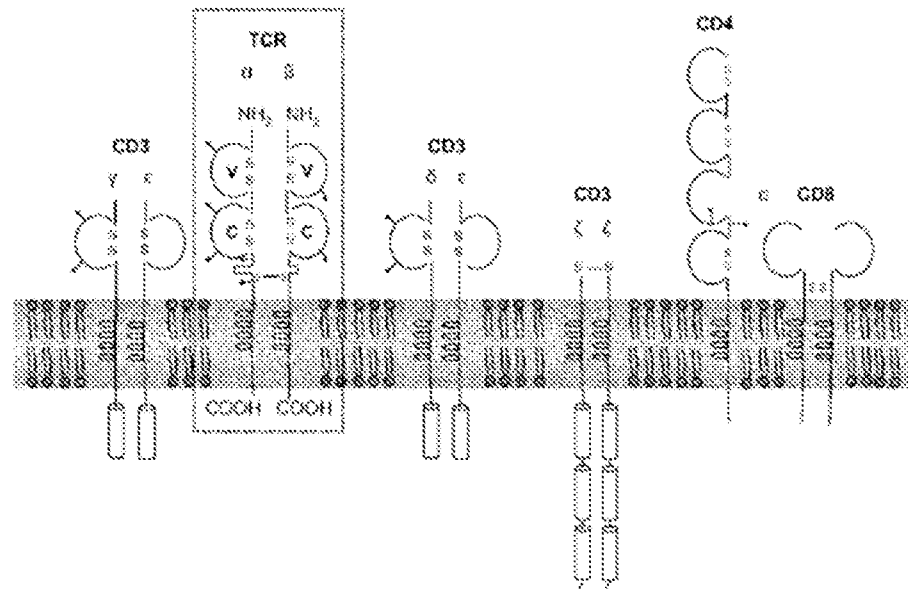


Figura 2

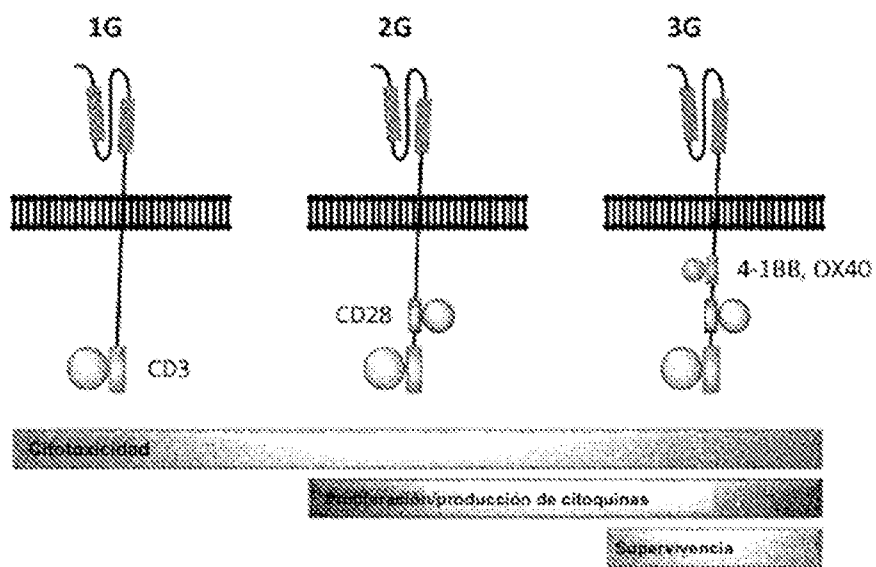


Figura 3

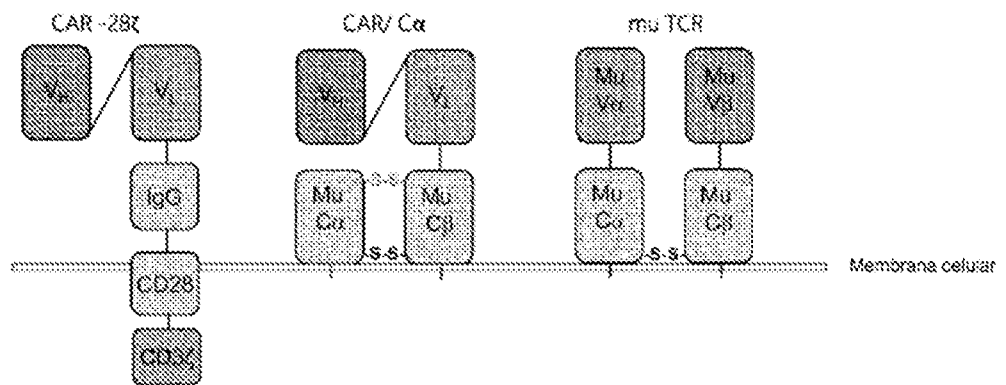


Figura 4

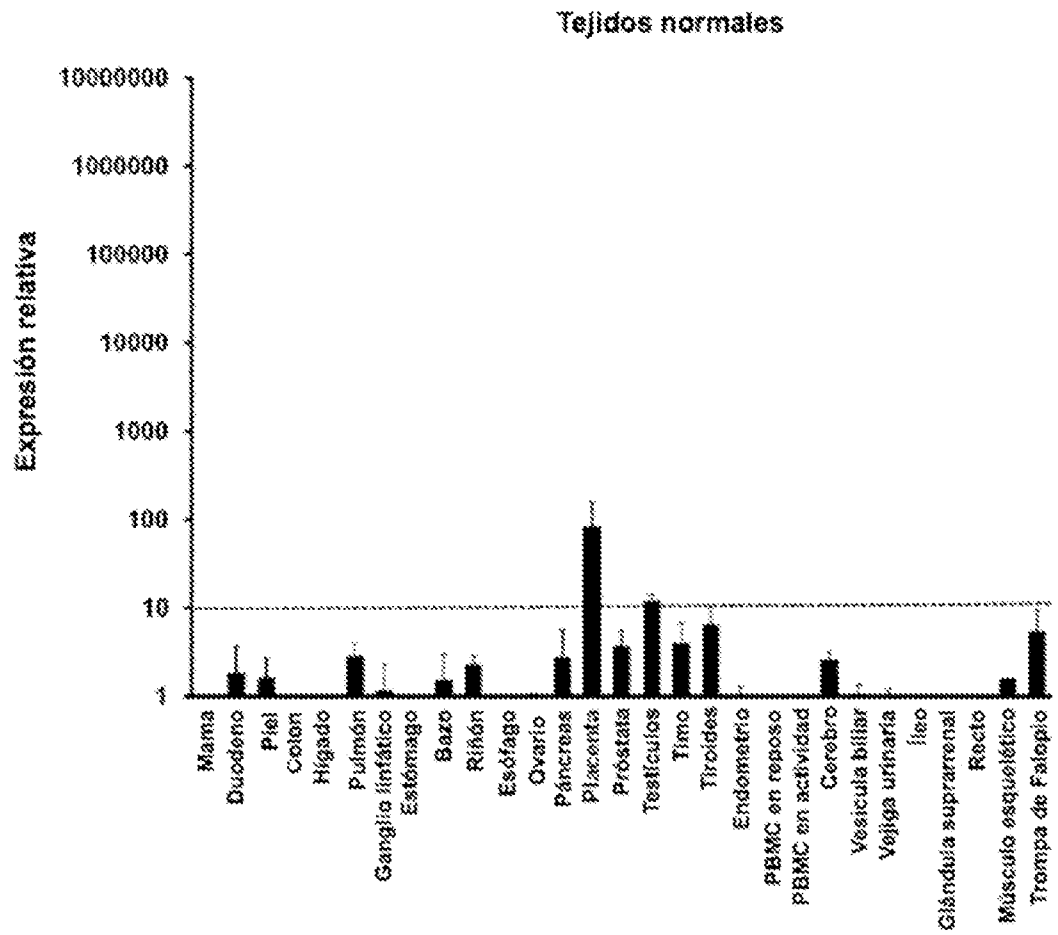


Figura 4 (continuación)

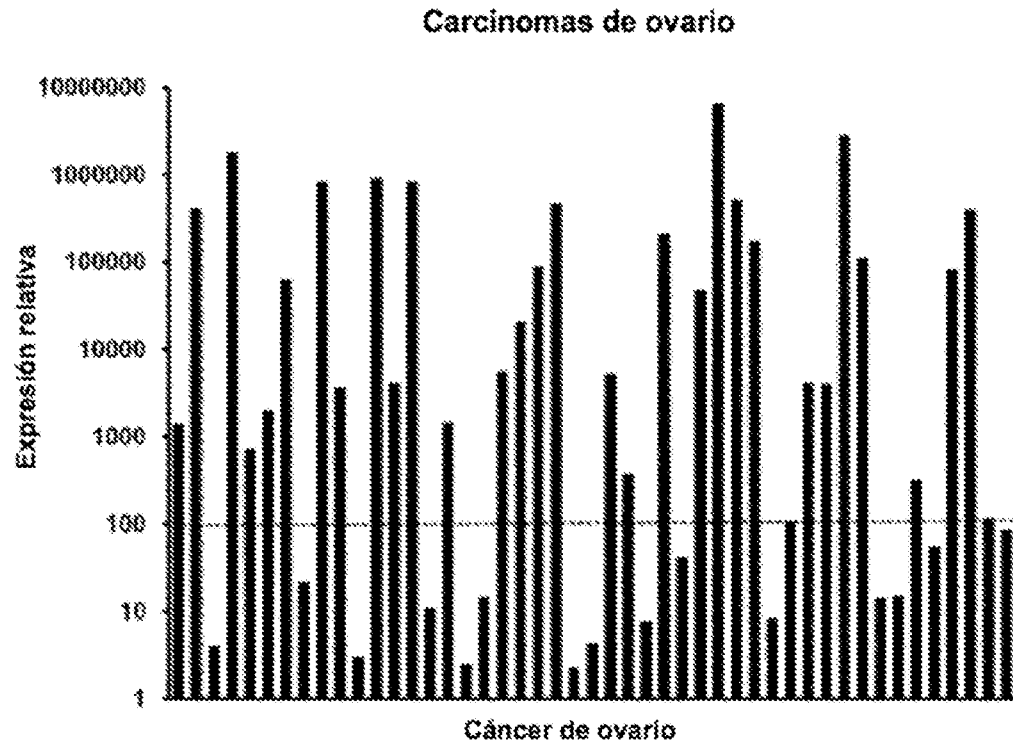
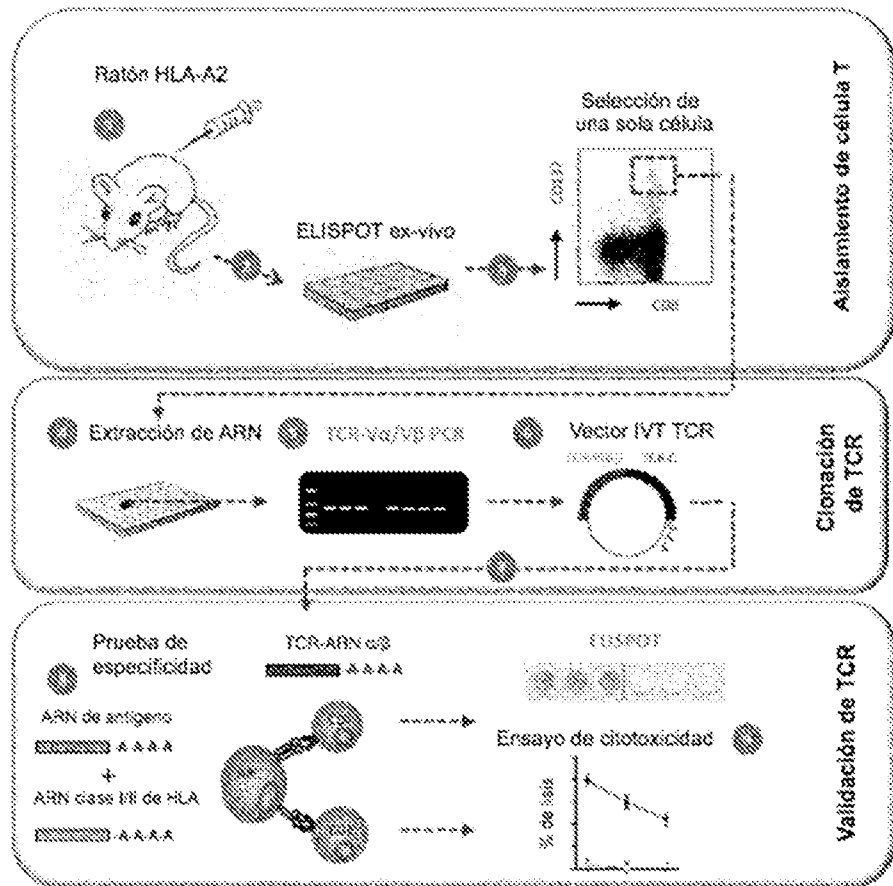
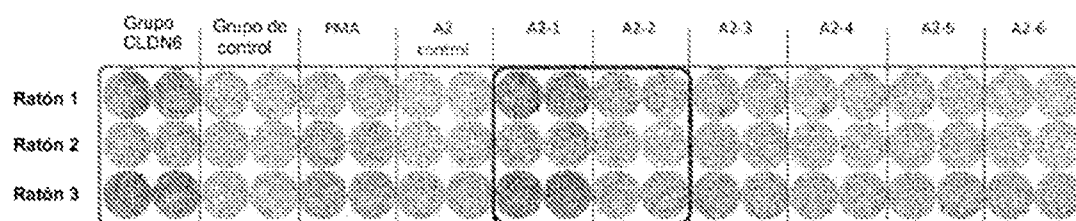


Figura 5





**Figura 6**



Péptidos de unión 02 de HLA-A\* de SYFPEITHY predicho

Nombre	Puntuación SYFPEITHY
A2-1	32
A2-2	30
A2-3	29
A2-4	29
A2-5	28
A2-6	26

**Figura 7**

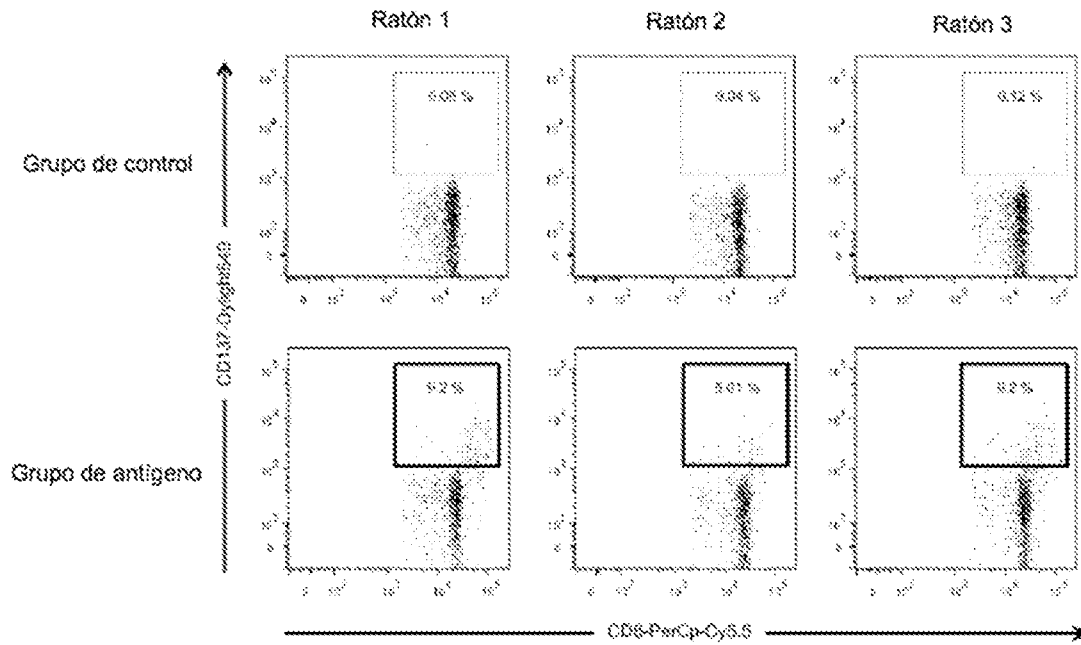


Figura 8

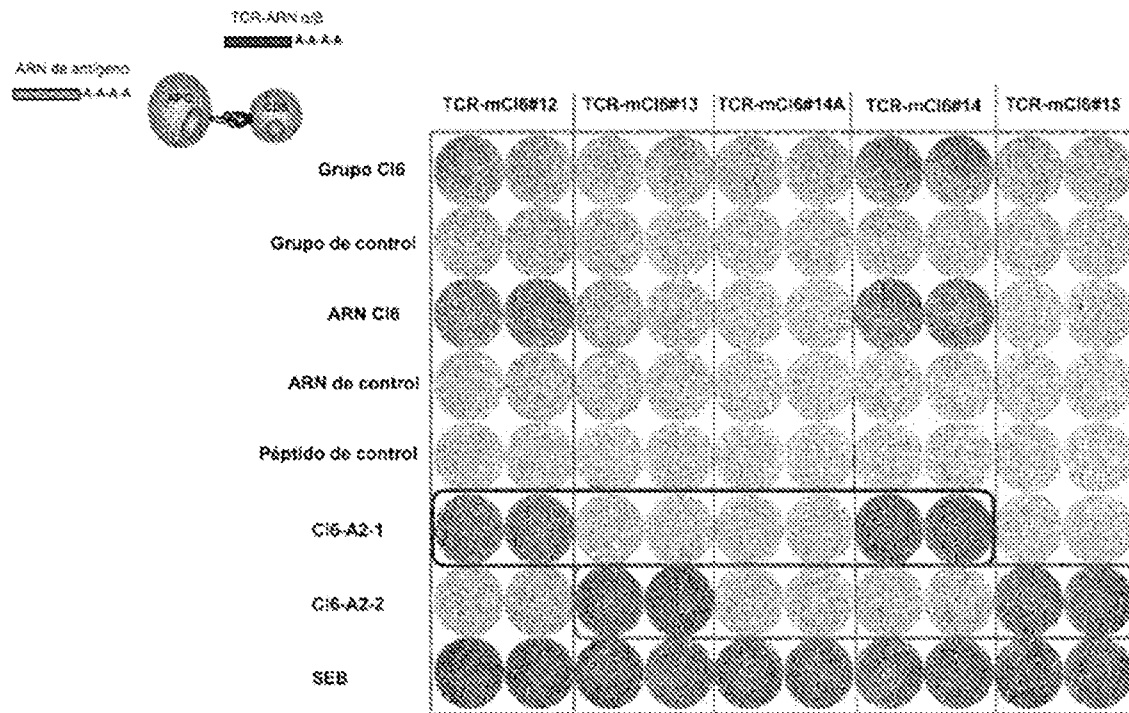


Figura 9

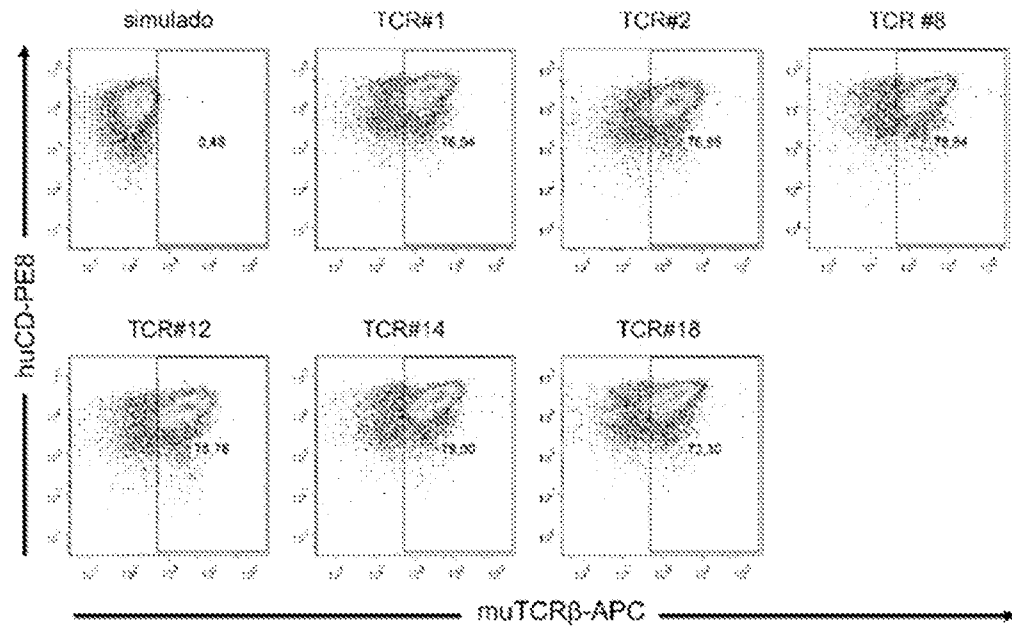


Figura 10

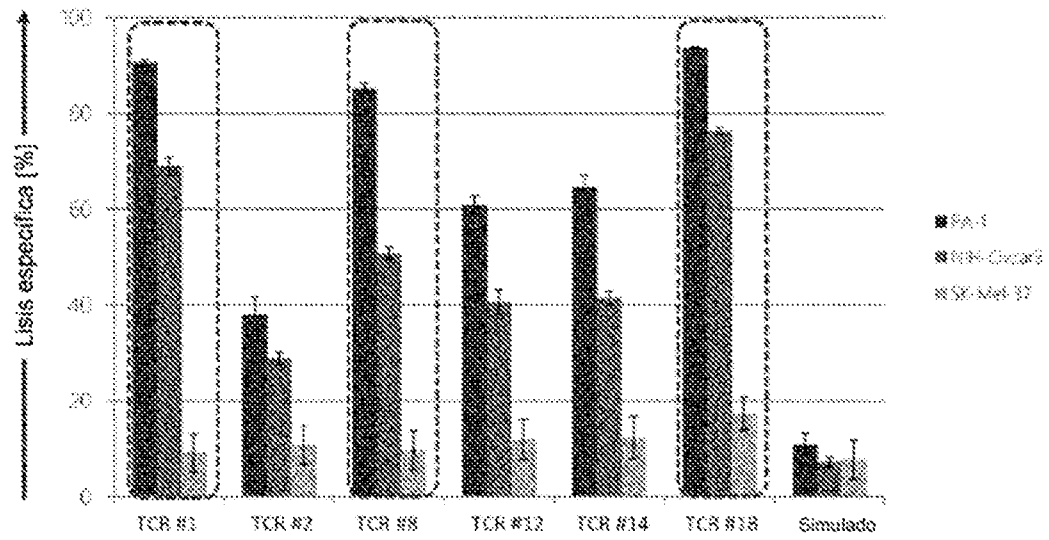
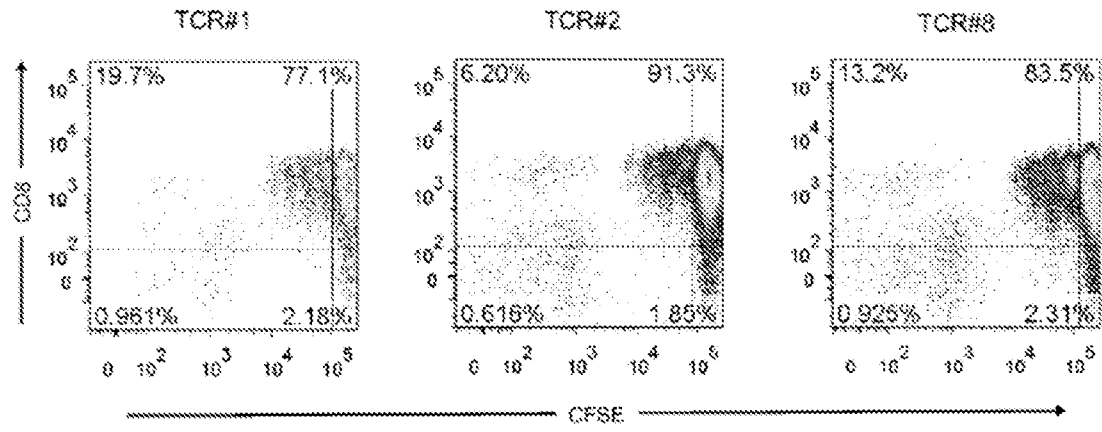


Figura 11

A)



**Figura 11**

A) (continuación)

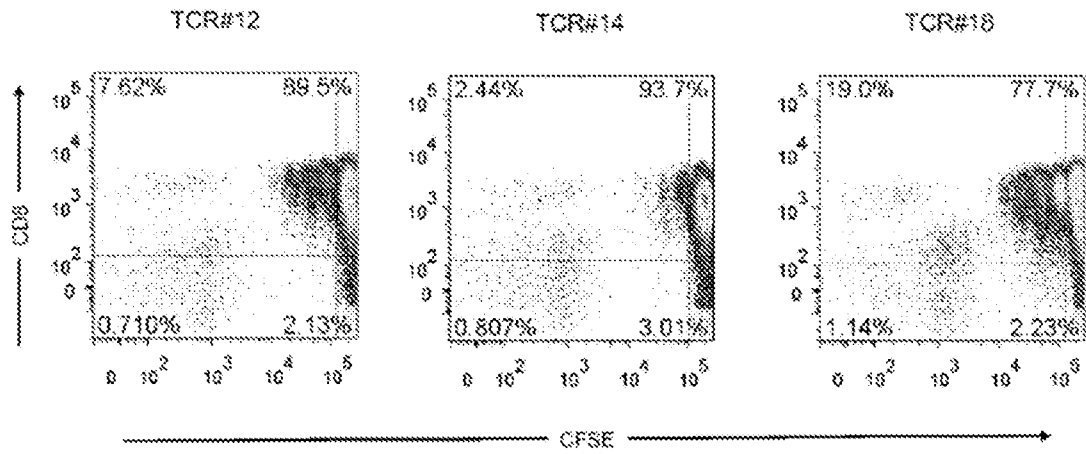


Figura 11

B)

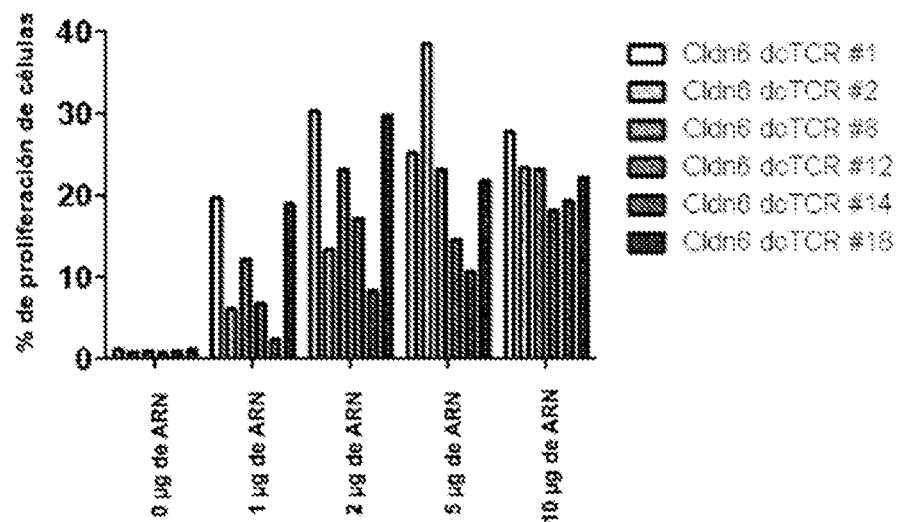




Figura 12

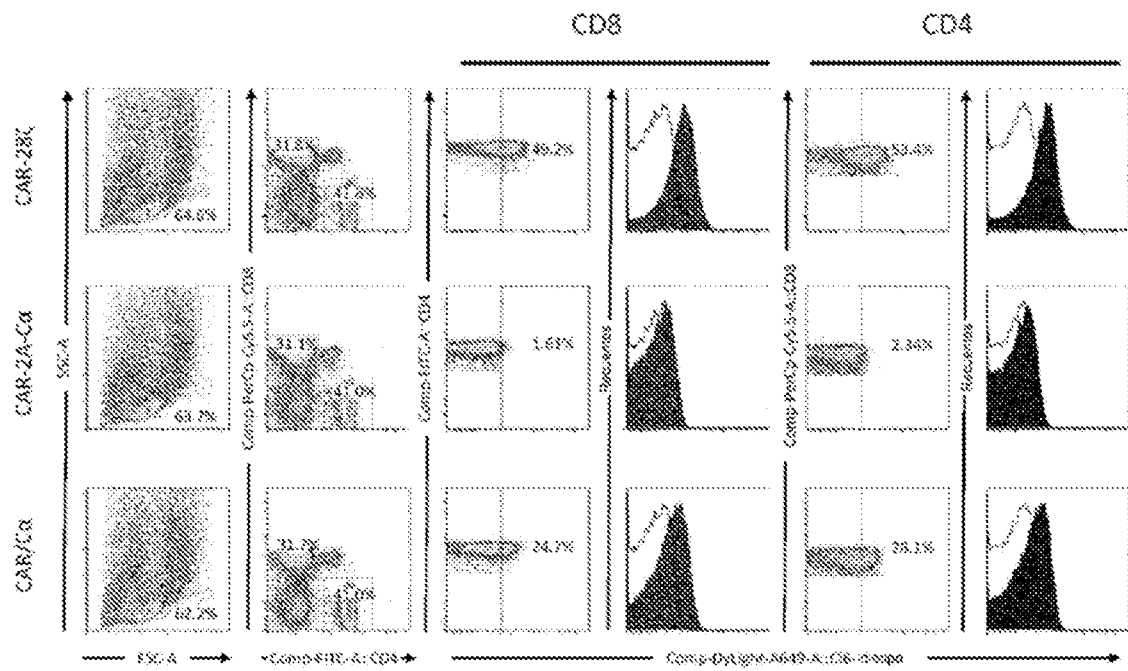


Figura 12 (continuación)

CAR-28ζ



CAR-2A-Cα



CAR/Cα



Figura 13

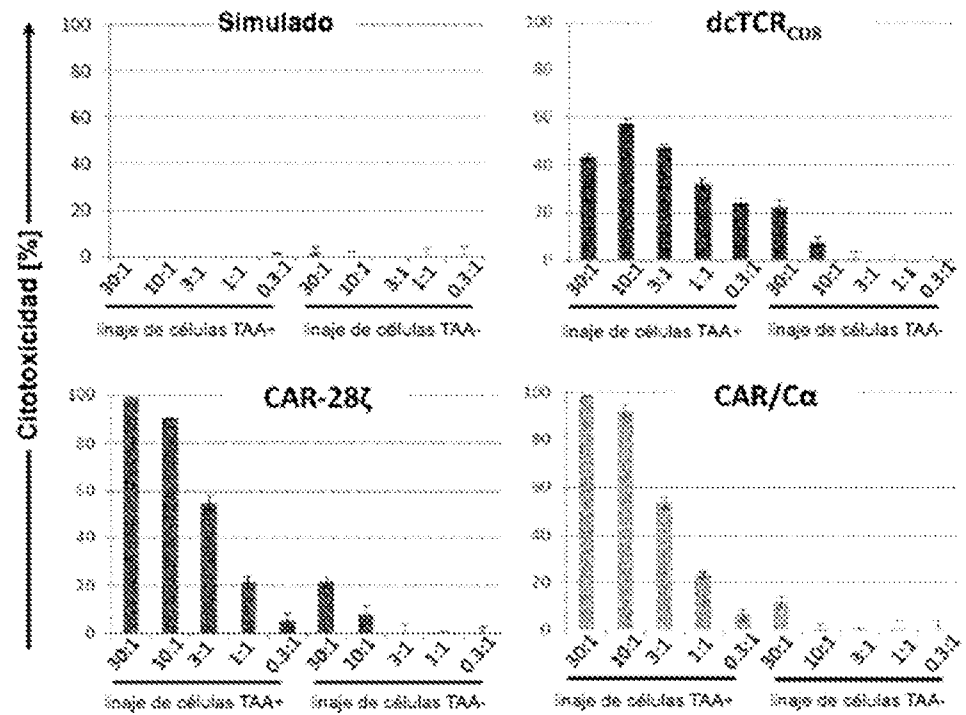


Figura 14

A)

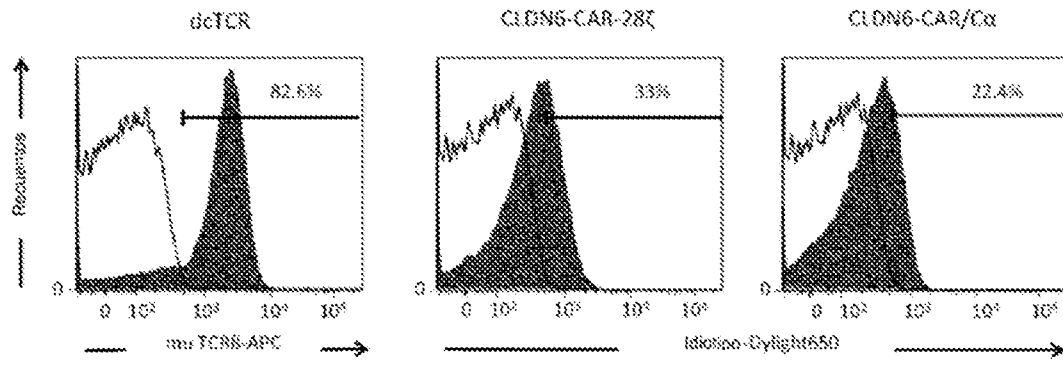


Figura 14

B)

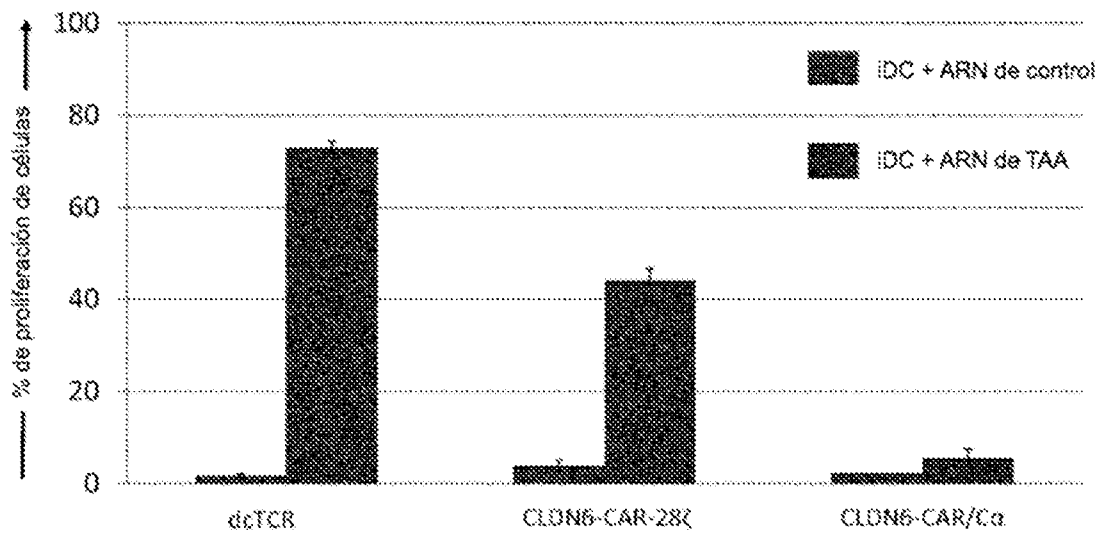


Figura 14

B) (continuación)

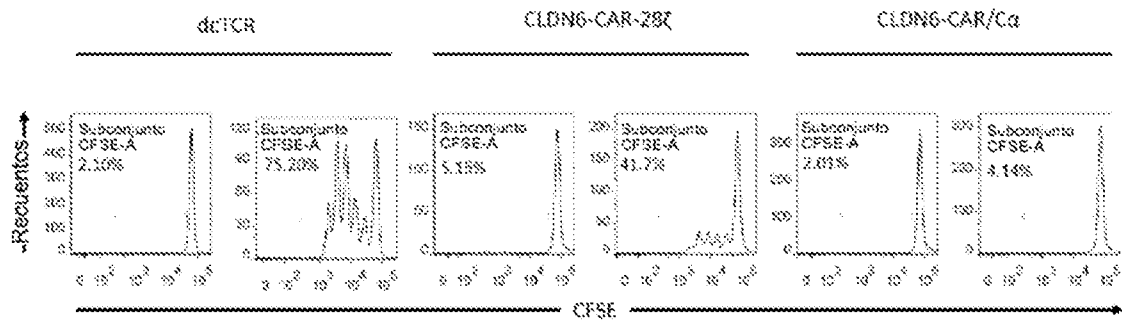


Figura 15

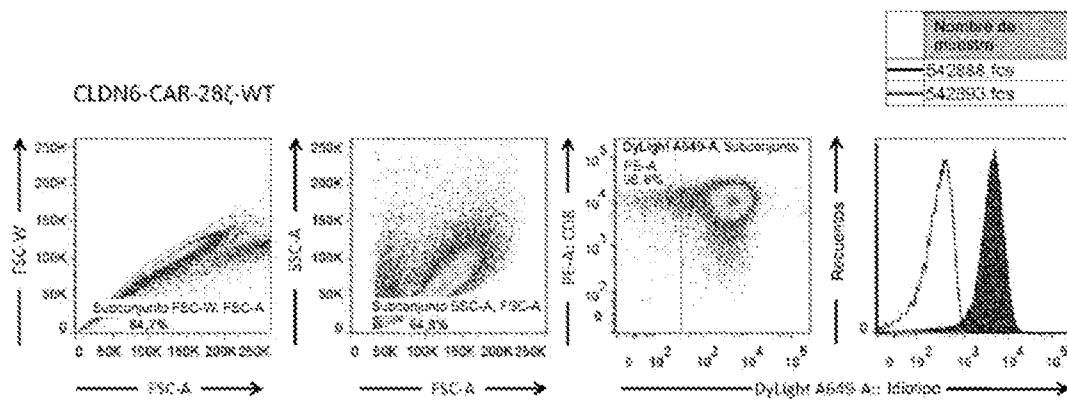


Figura 15 (continuación)

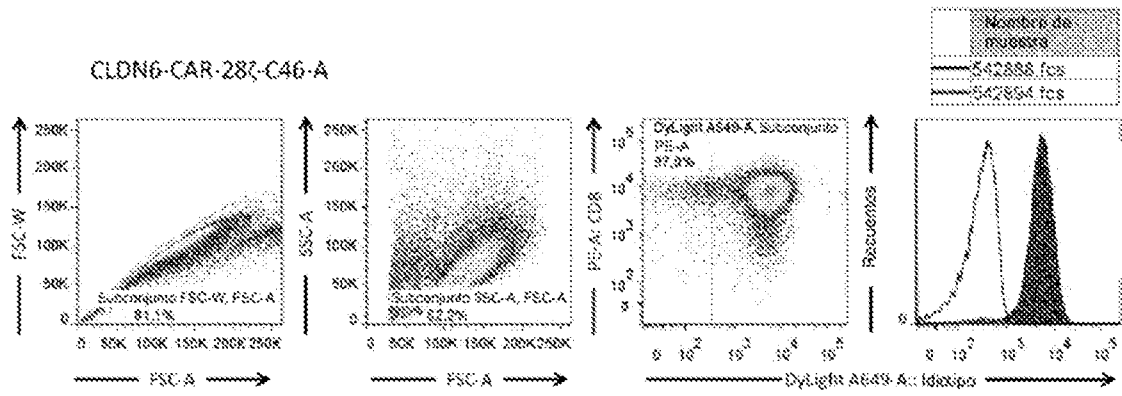




Figura 15 (continuación)

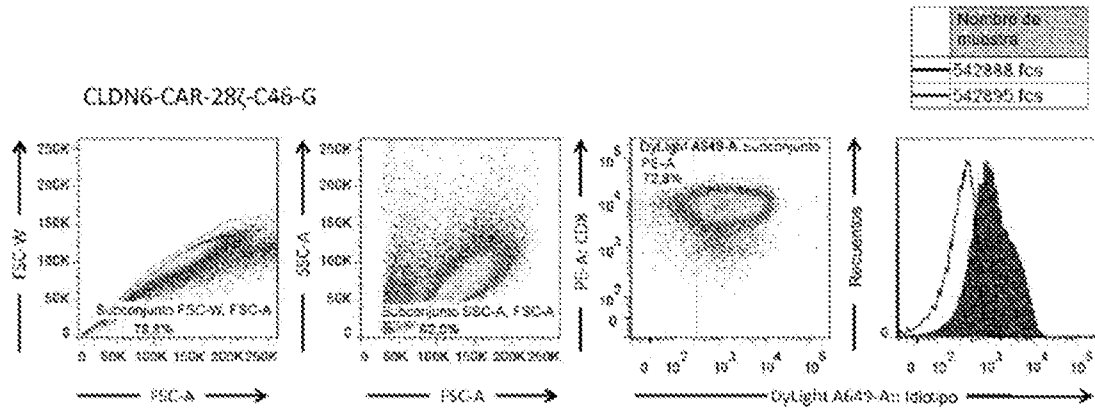


Figura 15 (continuación)

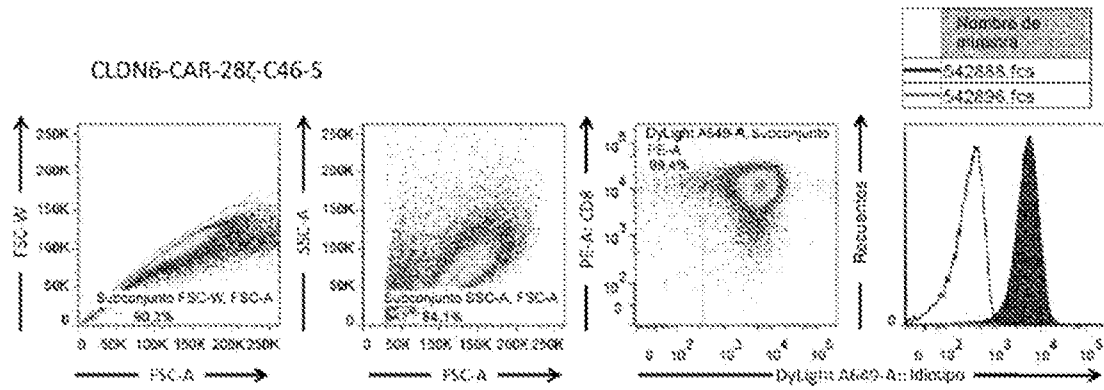


Figura 16

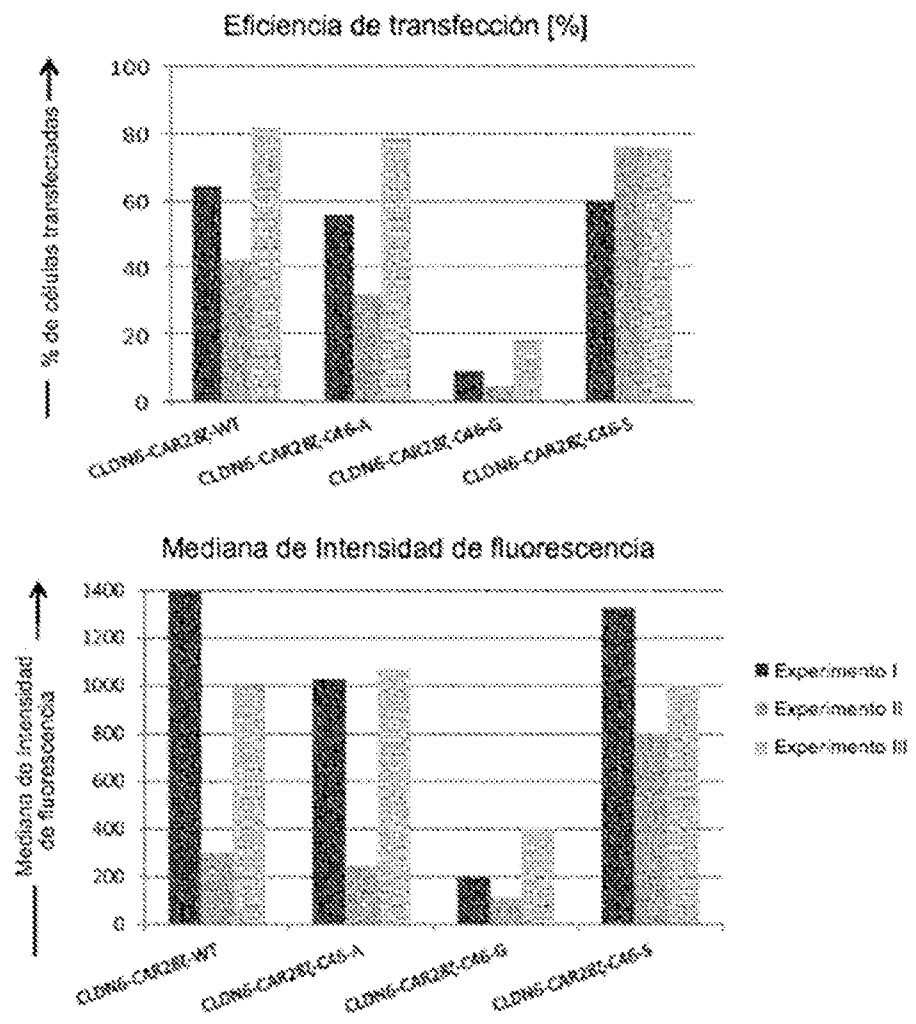


Figura 17

A)

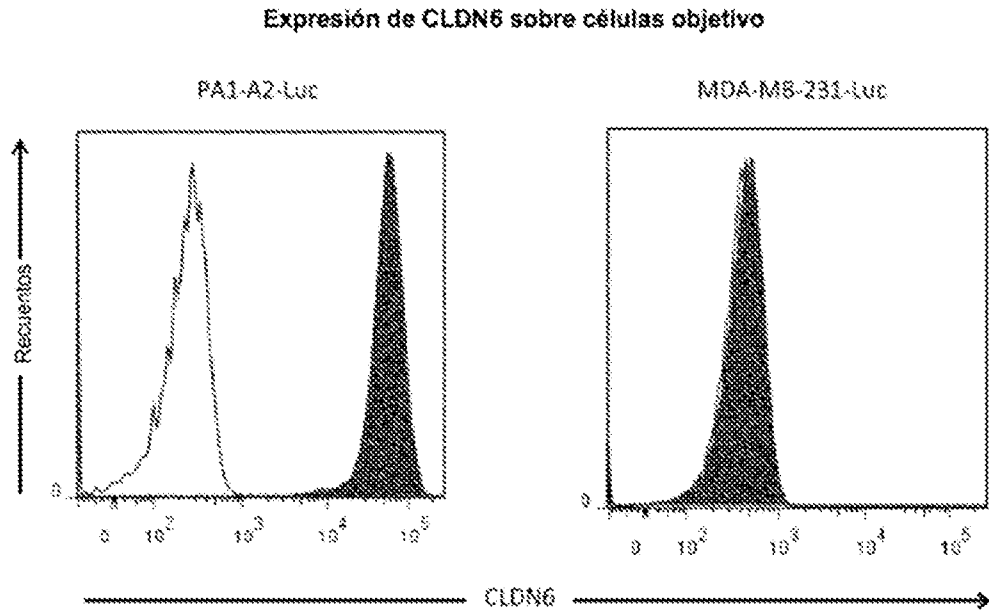


Figura 17

B)

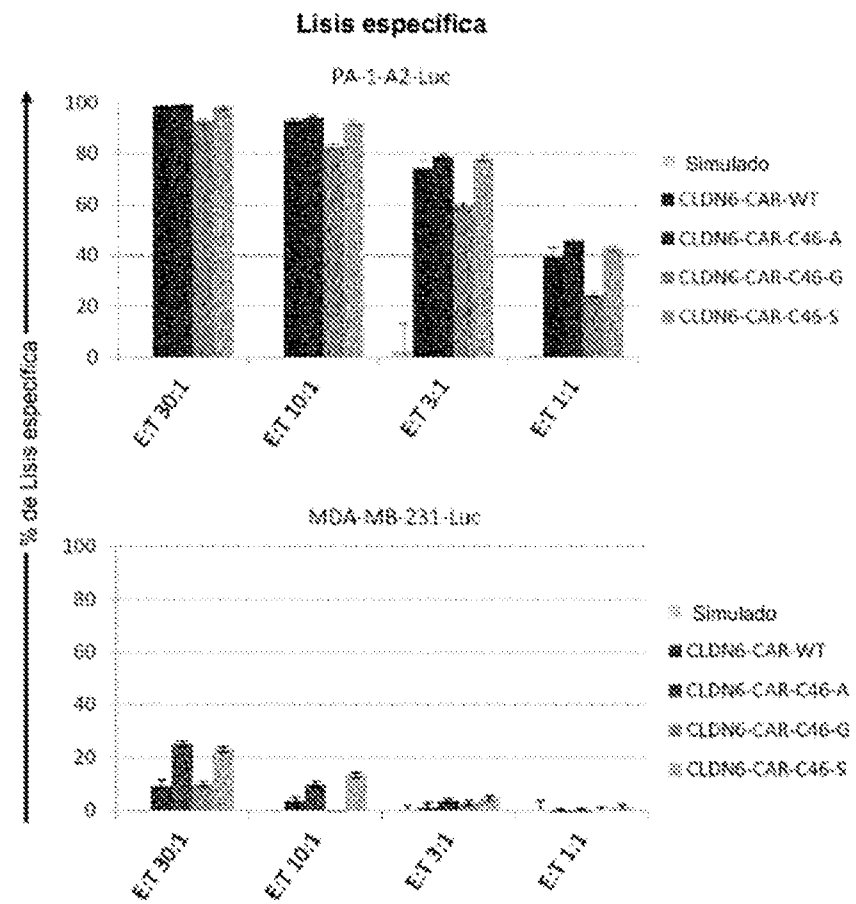


Figura 17

c)

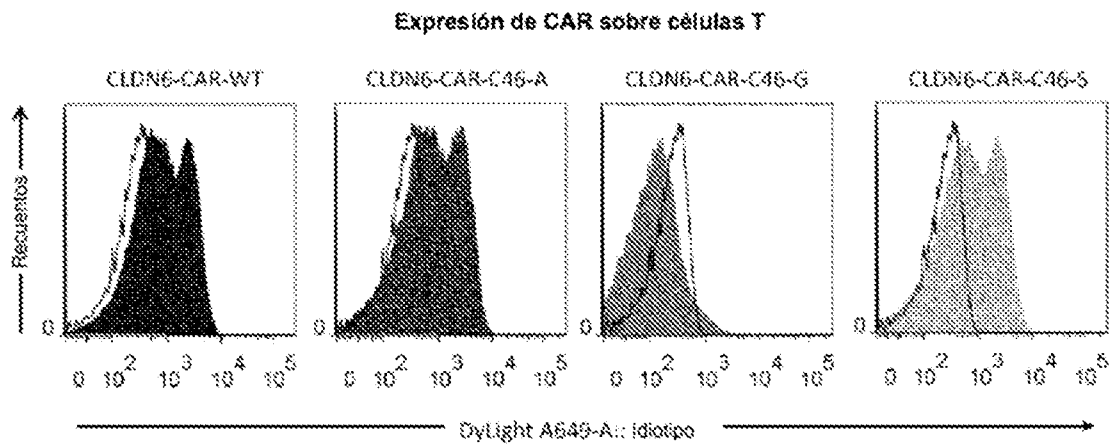


Figura 18

A)

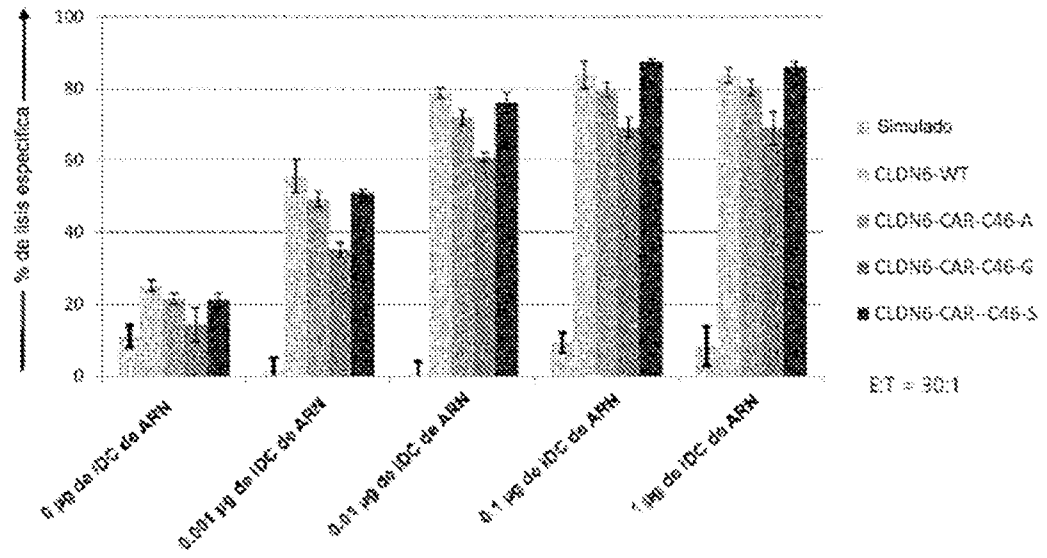


Figura 18

B)

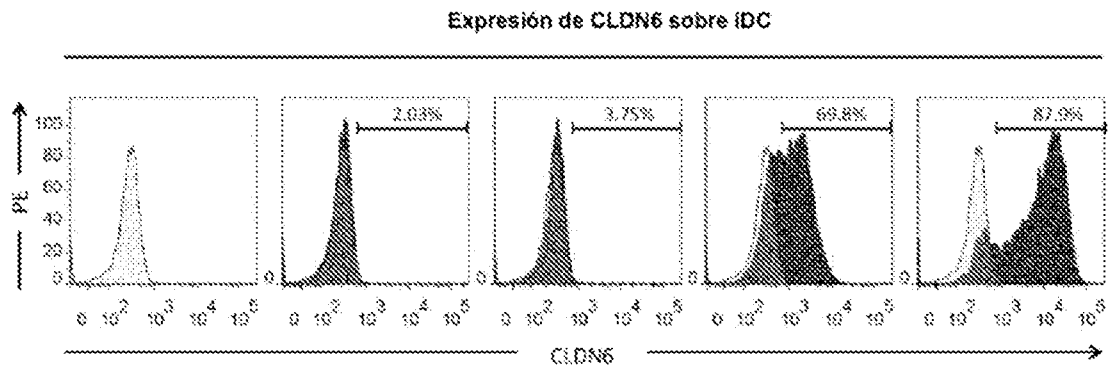




Figura 19

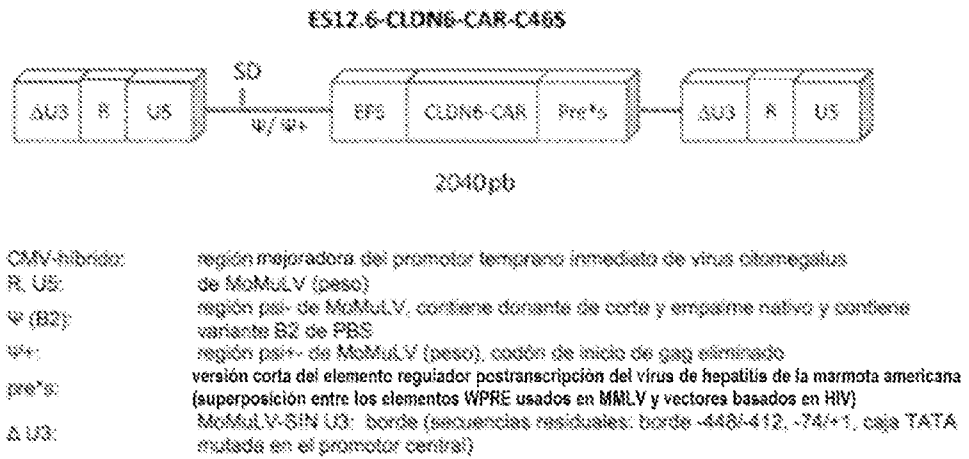


Figura 20

A)

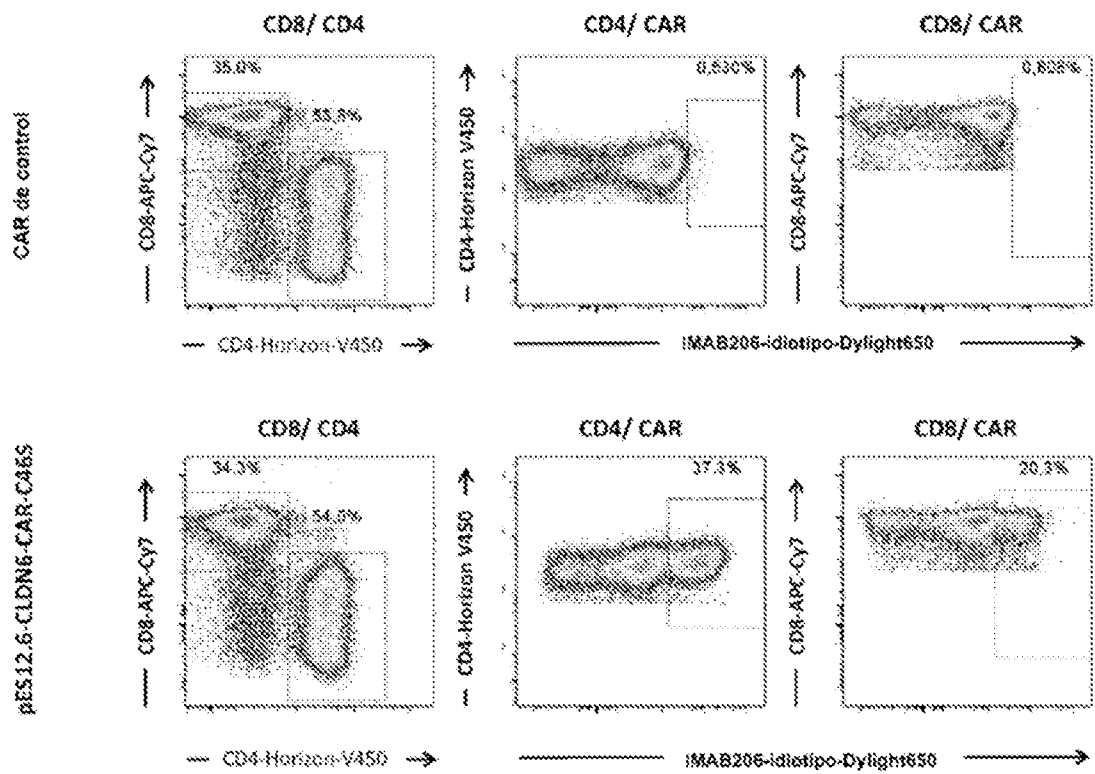


Figura 20

B)

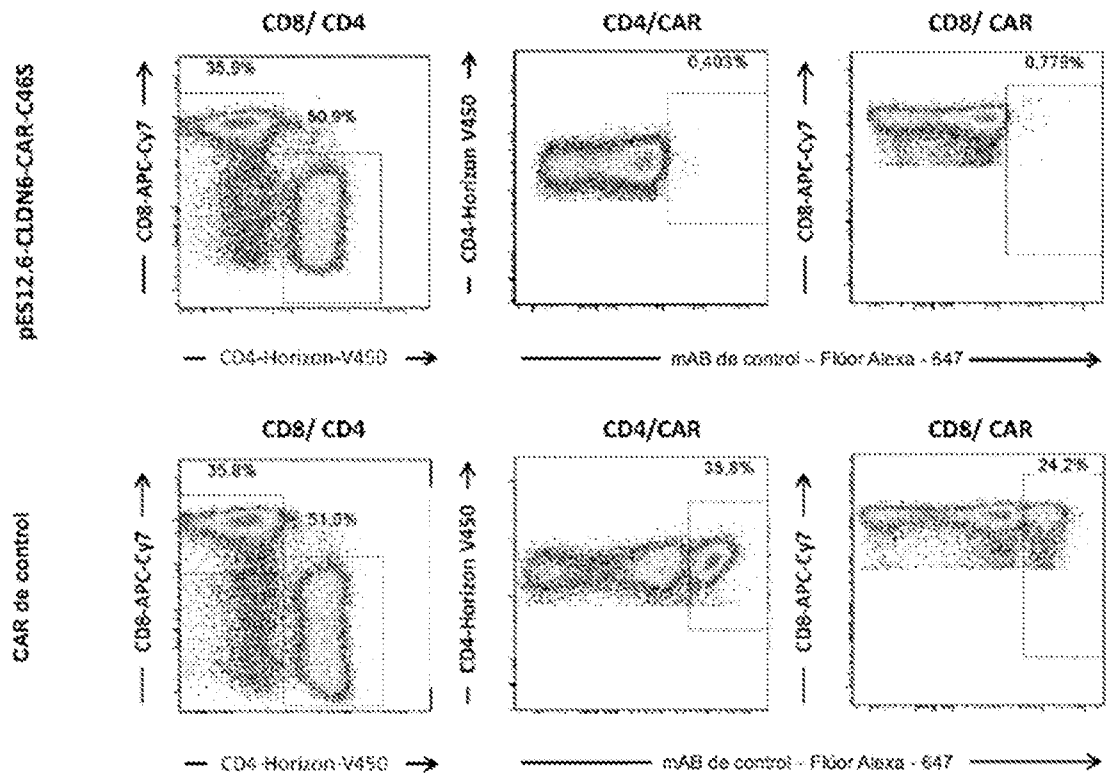
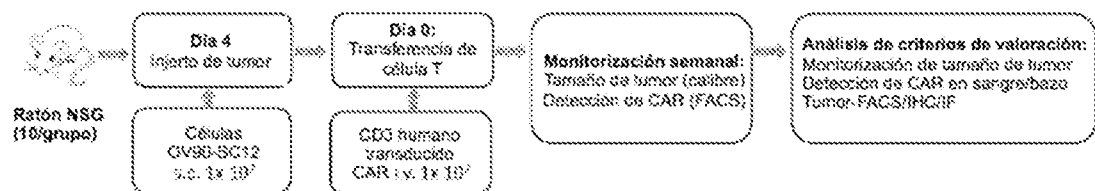


Figura 21

A)



B)

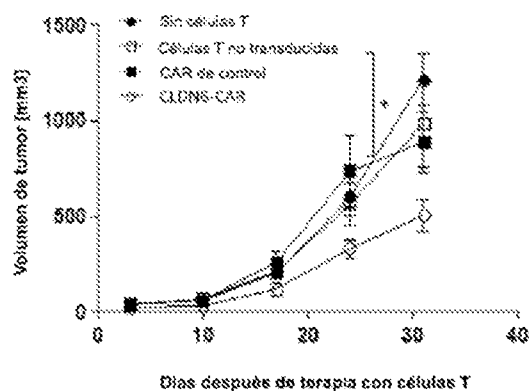


Figura 21

C)

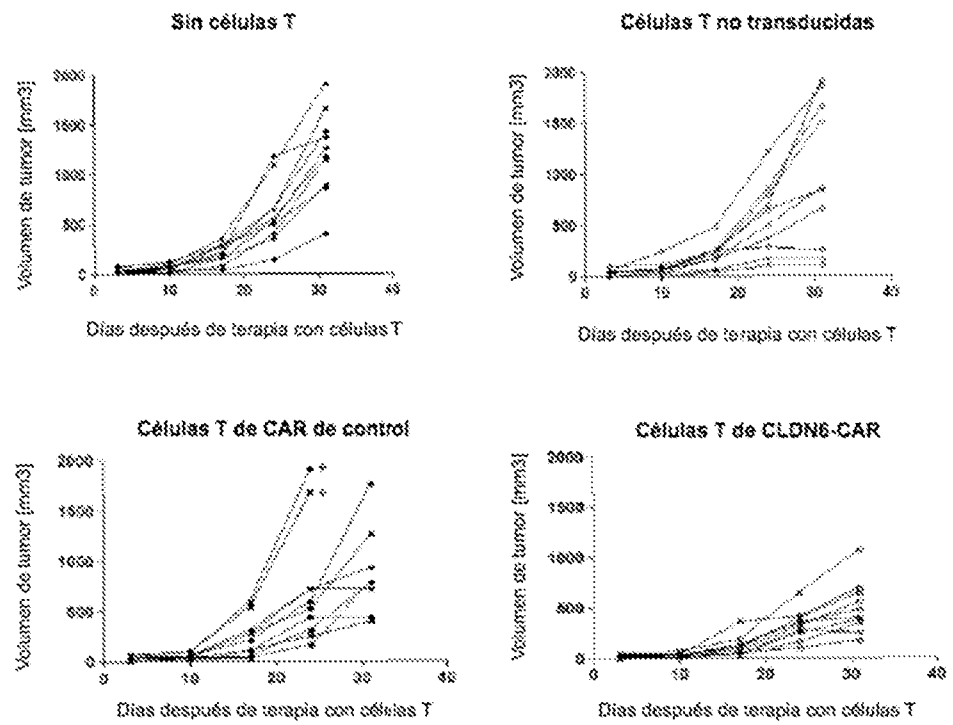


Figura 22

A)

CLDN6-CAR

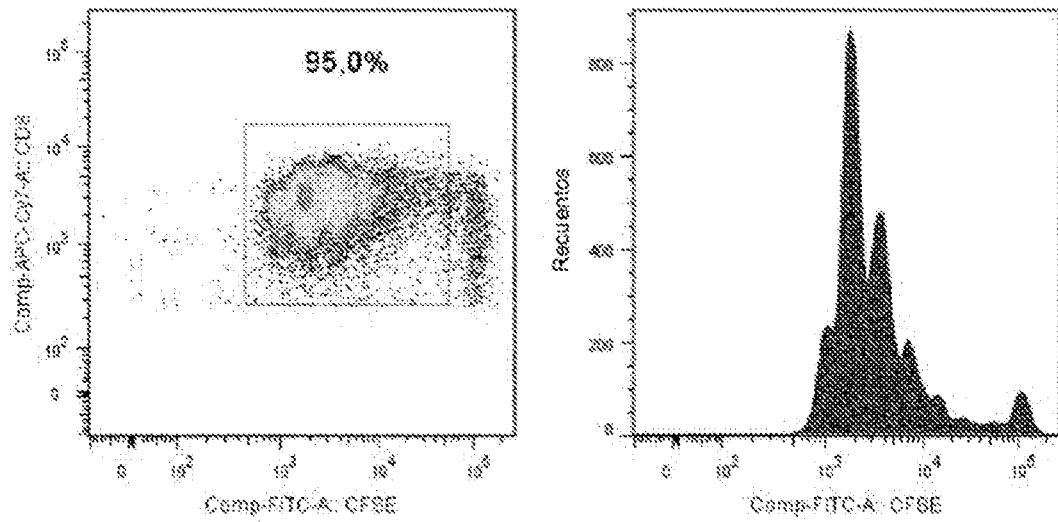


Figura 22

B)

CAR de control negativo

