

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 030**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

C07K 14/725 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2016 PCT/IB2016/000399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16142783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2016 E 16721219 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2022 EP 3268014**

54 Título: **Receptores de células T dirigidos contra el antígeno de melanoma expresado preferencialmente y usos de los mismos**

30 Prioridad:

10.03.2015 US 201562130884 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2023

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LEIDS UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM
(100.0%)
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**FALKENBURG, J.H., FREDERIK y
HEEMSKERK, MIRJAM, H.M.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 933 030 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

Receptores de células T dirigidos contra el antígeno de melanoma expresado preferencialmente y usos de los mismos

5 Campo

La tecnología se refiere en parte a composiciones y métodos para inducir una respuesta inmunitaria contra el Antígeno de Melanoma Expresado Preferencialmente (PRAME). Se proporcionan métodos para tratar enfermedades hiperproliferativas al inducir una respuesta inmunitaria contra el antígeno PRAME; la respuesta inmunitaria se puede inducir dirigiéndose específicamente a células que expresan PRAME utilizando receptores de células T dirigidos contra PRAME.

Antecedentes

La activación de las células T es una etapa importante en la inmunidad protectora contra microorganismos patógenos (por ejemplo, virus, bacterias y parásitos), proteínas extrañas y sustancias químicas dañinas en el medio ambiente, y también como inmunidad contra el cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas. Las células T expresan receptores sobre sus superficies (es decir, receptores de células T) que reconocen los antígenos presentados sobre la superficie de las células. Durante una respuesta inmunitaria normal, la unión de estos antígenos al receptor de células T, en el contexto de la presentación del antígeno MHC, inicia cambios intracelulares que conducen a la activación de las células T.

La terapia de células T adoptivas se ha utilizado para tratar enfermedades hiperproliferativas, que incluyen los tumores, al proporcionar una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un método implica el uso de células T modificadas genéticamente que expresan una proteína específica de antígeno que tiene un dominio extracelular que se une a un antígeno.

Amir et al divulgan células T restringidas con Allo-HLA específicas de PRAME con una potente reactividad antitumoral útil para la transferencia terapéutica del gen del receptor de células T (Amir A.L et al, Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 1 Sep 2011, (2011-09-01), vol. 17, no. 17, páginas 5615 - 5625).

Van Loenen et al. divulgan un vector multicistrónico que codifica un interruptor de seguridad optimizado para la terapia adoptiva con células T modificadas con receptor de células T (Van Loenen M.M et al, Gene Therapy, Aug 2013, (2013-08), vol. 20, no. 8, páginas 861 - 867).

35 Resumen

El gen PRAME se expresa en un alto nivel en una gran proporción de tumores, que incluyen melanomas, carcinomas de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales (RCC), carcinoma de mama, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de colon, sarcoma, neuroblastoma, así como varios tipos de leucemia. Se identificaron clones de células T específicas de PRAME que reconocen estos diferentes tipos de tumores, que incluyen el sarcoma de Ewing, el sarcoma sinovial y las estirpes celulares de neuroblastoma. Los enfoques de transferencia de genes de TCR que utilizan TCR específicos de PRAME pueden aportar nuevas modalidades de tratamiento para pacientes con enfermedades hiperproliferativas tales como, por ejemplo, sarcomas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, melanomas uveales y neuroblastomas.

En el presente documento se proporcionan composiciones y métodos que comprenden receptores de células T, ácidos nucleicos que codifican receptores de células T y células que expresan receptores de células T que reconocen PRAME. Las células también pueden expresar un polipéptido de caspasa-9 inducible.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica CDR3, en el que el polinucleótido que codifica CDR3 codifica la región CDR3 de un receptor de células T que se une específicamente al antígeno expresado preferencialmente en melanoma (PRAME), en el que: a) el polinucleótido que codifica CDR3 comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende las regiones VJ de un polipéptido TCR α , en el que el primer polipéptido comprende la región CDR3 del polipéptido TCR α , y en el que la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; y b) el polinucleótido que codifica CDR3 comprende un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende las regiones VDJ de un polipéptido TCR β , en el que el segundo polipéptido comprende la región CDR3 del polipéptido TCR β , y en el que la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; en la que la región CDR3 del polipéptido TCR α y la región CDR3 del polipéptido TCR β juntas se unen específicamente a PRAME.

Adecuadamente, el primer polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y el segundo polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

Adecuadamente, la molécula de ácido nucleico puede codificar un receptor de células T, en el que las regiones CDR3 del receptor de células T se unen específicamente a un polipéptido PRAME que comprende la secuencia de aminoácidos SLLQHLIGL.

- Adecuadamente, el primer polinucleótido puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33; y el segundo polinucleótido puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 35 o SEQ ID NO: 36.
- 5 Adeuadamente, la región CDR3 del receptor de células T puede unirse específicamente a un complejo de péptido-MHC, en el que la molécula de MHC es una molécula HLA de clase I de MHC y el péptido es un epítipo PRAME.
- 10 Adeuadamente, la molécula de ácido nucleico puede comprender además un promotor ligado operativamente al polinucleótido que codifica CDR3.
- Adeuadamente, la molécula de ácido nucleico puede comprender además un polinucleótido que codifica un polipéptido Caspasa-9 quimérico que comprende una región de unión a ligando multimérico y un polipéptido Caspasa-9.
- 15 En otro aspecto, se proporciona un vector plasmídico o vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.
- En otro aspecto, se proporciona una célula modificada transfectada o transducida con una molécula de ácido nucleico de la invención.
- 20 En otro aspecto, se proporciona una célula modificada transfectada o transducida con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de células T que se une específicamente al antígeno expresado preferencialmente en melanoma (PRAME), en el que la molécula de ácido nucleico comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende las regiones VJ de un polipéptido TCR α , en el que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; y un segundo polinucleótido codifica un segundo polipéptido que comprende las regiones VDJ de un polipéptido TCR β , en el que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.
- 25 Adeuadamente, el primer polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y el segundo polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.
- En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula modificada de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 Adeuadamente, la composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto diagnosticado con una enfermedad o afección hiperproliferativa, en la que se va a administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica al sujeto.
- Adeuadamente, la composición farmacéutica de la invención se puede utilizar para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células a una población de células diana o tejido en un sujeto, en el que se va a administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica al sujeto.
- 40 En otro aspecto, se proporciona un método in vitro para expresar un receptor de células T que se une específicamente a PRAME en una célula, que comprende poner en contacto una molécula de ácido nucleico de la invención con una célula bajo condiciones en las que el ácido nucleico se incorpora a la célula, por lo que la célula expresa el receptor de células T del ácido nucleico incorporado.
- 45 Ciertas realizaciones se describen con más detalle en la siguiente descripción, ejemplos, reivindicaciones y dibujos.
- 50 La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Todos los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento que no están abarcados en las reivindicaciones se incluyen solo como aspectos o realizaciones de la divulgación. Todos los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento en relación con los métodos de tratamiento se incluyen solo como aspectos o realizaciones de la divulgación.
- 55 Breve descripción de los dibujos
- Los dibujos ilustran ciertas realizaciones de la tecnología y no son limitantes. Para mayor claridad y facilidad de ilustración, los dibujos no están hechos a escala y, en algunos casos, varios aspectos pueden mostrarse exagerados o ampliados para facilitar la comprensión de las realizaciones particulares.
- 60 La Figura 1A proporciona un esquema de los componentes de la terapia de células T adoptivas; La Figura 1B proporciona un gráfico de barras de la expresión del antígeno en varios tejidos.
- La Figura 2A proporciona un esquema que ilustra un ejemplo de un método utilizado para generar una biblioteca de clones de células T; La Figura 2B proporciona un gráfico de barras de la producción de citocinas.
- 65

- La Figura 3 proporciona los resultados de un análisis FACs que muestra el aislamiento de células T CD8⁺ activadas después de la terapia con células madre de emparejamiento erróneo con HLA. El receptor del paciente era HLA-A2+ y el donante era HLA-A2-.
- 5 Las Figuras 4A-4C proporcionan gráficos de barras que miden la especificidad tumoral de tres clones de células T diferentes. La Figura 4A proporciona un gráfico de barras para el clon 12; la Figura 4B proporciona un gráfico de barras para el clon 35; la Figura 4C proporciona un gráfico de barras para el clon 54.
- 10 Las Figuras 5A-5C proporcionan gráficos de IFN γ que muestran que el clon de células T es específico de PRAME. La Figura 5A proporciona un gráfico de la 1^a dim: fracciones de HPLC de agua/ACN/TFA; la Figura 5B proporciona un gráfico de la 2^a dim: fracciones de HPLC de agua/IPA/TFA; La Figura 5C proporciona un gráfico de la 3^a dim: fracciones de HPLC de agua/ANC/ácido fórmico.
- 15 Las Figuras 6A-6C proporcionan resultados de experimentos que comparan la avidéz de células T específicas de PRAME alo-restringidas y no alo-restringidas. La Figura 6A proporciona resultados de FAC; la Figura 6B proporciona un gráfico de líneas; La Figura 6C proporciona un gráfico de barras.
- 20 Las Figuras 7A y 7B son gráficos de barras que muestran la alta especificidad de las células T restringidas alo-HLA específicas de PRAME. La Figura 7A proporciona un gráfico de barras que representa estirpes celulares de melanoma; La Figura 7B proporciona un gráfico de barras que representa muestras de AML primarias.
- La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra la reactividad limitada del clon de células T específicas de PRAME frente a células dendríticas maduras (DC) derivadas de células CD34⁺ sanas.
- 25 La Figura 9 es un diagrama de dispersión que muestra que el reconocimiento de células por el clon de células T específico de PRAME se correlaciona con el nivel de expresión de PRAME de la célula diana.
- 30 Las Figuras 10A-10C son gráficos de barras que muestran que el Silenciamiento de la expresión de PRAME por ARNhp se correlacionó con una reactividad reducida de un clon de células T específico de PRAME. La Figura 10A proporciona un gráfico de barras que representa el carcinoma de células renales RCC 1257; la Figura 10B proporciona un gráfico de barras que representa células dendríticas maduras derivadas de células CD34⁺ (CD34 mDC); la Figura 10C proporciona un gráfico de barras que representa las células epiteliales tubulares proximales (PTEC).
- 35 La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra la alta reactividad tumoral de las células T transducidas con PRAME-TCR.
- La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra la reactividad de las células T transducidas con construcciones TCR de PRAME, con o sin un polipéptido que codifica caspasa-9, frente a células diana con o sin tratamiento con AP1903.
- 40 La Figura 13 proporciona gráficos de barras que muestran la reactividad de clones de células T específicas de PRAME frente a células de sarcoma de Ewing con o sin tratamiento durante 48 h con IFN- γ /IFN- α . La expresión de HLA con o sin IFN- γ /IFN- α de las estirpes celulares de sarcoma de Ewing se muestra en la parte derecha de la Figura. La Figura 13 se proporciona en el presente documento en 6 páginas de dibujos.
- 45 La Figura 14 proporciona gráficos de barras que muestran la reactividad de los clones de células T específicas de PRAME frente a células de neuroblastoma con o sin tratamiento durante 48 h con IFN- γ /IFN- α . La expresión de HLA con o sin IFN- γ /IFN- α de las estirpes celulares de neuroblastoma se muestra en la parte derecha de la Figura. La Figura 14 se proporciona en el presente documento en 4 páginas de dibujos.
- 50 Las Figuras 15A y 15B son gráficos de barras que muestran la reactividad de las células T transducidas con construcciones TCR de PRAME y TCR + icasp9 de PRAME contra células de melanoma. 15A) sin tratamiento AP1903, 15B) con tratamiento AP1903.
- 55 Las Figuras 16A-16D son gráficos de barras que muestran el reconocimiento de células de sarcoma de Ewing por clones de células T específicas de PRAME. Las estirpes celulares de sarcoma de Ewing se trataron con o sin IFN- γ /IFN- α durante 48 h. La Figura 16A proporciona un gráfico de barras de las estirpes celulares EW3; la Figura 16B proporciona un gráfico de barras de la expresión de HLA de la estirpe celular EW3 con o sin IFN- γ /IFN- α ; la Figura 16C proporciona un gráfico de barras de las estirpes celulares EW-7; La Figura 16D proporciona un gráfico de barras de la estirpe celular EW3 con o sin IFN- γ /IFN- α .
- 60 La Figura 17A proporciona la secuencia de aminoácidos del clon 54SLL de PRAME. (TRAV8-4*04) en una construcción PRAME/icasp9; la Figura 17B proporciona la secuencia de aminoácidos del clon 54SLL de PRAME (TRBV9*01) en una construcción PRAME/icasp9.
- 65 La Figura 18A proporciona la secuencia de aminoácidos del clon 46SLL de PRAME (TRAV35*02), la Figura 18B proporciona la secuencia de aminoácidos del clon 46SLL de PRAME (TRBV28*01).

La Figura 19A proporciona la secuencia de aminoácidos del clon DSK3 QLL de PRAME (TRAV12-2*01), la Figura 19B proporciona la secuencia de aminoácidos del clon DSK3 QII de PRAME (TRBV9*01).

5 La Figura 20A proporciona un gráfico de barras de la expresión de PRAME en muestras de células de AML primarias. La Figura 20B proporciona un diagrama de barras de la reactividad de las células T específicas de PRAME frente a muestras de células de AML primarias.

10 La Figura 21A proporciona una línea de tiempo de un ensayo de respuesta tumoral en ratones después del tratamiento con células que expresan TCR de PRAME en un modelo de xenoinjerto de ratón inmunodeficiente NSG; la Figura 21B proporciona fotografías de ratones tratados con células que expresan TCR PRAME y no transducidas (NT) ((Célula A) en los días 7-35; la Figura 21C proporciona fotografías de ratones tratados con células que expresan TCR PRAME y no transducidas (NT) en los días 41-74; la Figura 21D proporciona una escala de colores de fluorescencia; la Figura 21E proporciona un gráfico lineal de la radiancia promedio de los tumores en ratones tratados con las células no transducidas; la Figura 21F proporciona un gráfico lineal de la radiancia promedio de los tumores en ratones tratados con las células de control (NT) y los ratones tratados con las células que expresan TCR de PRAME, la Figura 21G proporciona un gráfico lineal de la radiancia promedio de los tumores en ratones tratados con las células que expresan TCR de PRAME.

20 La Figura 22A proporciona un análisis FAC del bazo de ratones tratados con células T que expresan TCR de PRAME después de la administración de rimiducid; La Figura 22B proporciona un gráfico que resume el análisis de FAC de la Figura 22A.

25 La Figura 23A proporciona resultados de citometría de flujo de células de médula ósea y bazo que se recolectaron de ratones tratados con NT o Célula A el día 51 después de la inyección de células T (día 74 posterior a la implantación del tumor), se contaron y analizaron para la expresión de CD8+; la Figura 23B proporciona un análisis de citometría de flujo de las células contadas y analizadas para la expresión de CD4+; la Figura 23C proporciona un análisis de citometría de flujo de las células contadas y analizadas para expresión de Vβ1 en células T CD8+; La Figura 23D proporciona un análisis de citometría de flujo de las células contadas y analizadas para expresión de Vβ1 en células T CD4+.

30 La Figura 24 proporciona resultados de citometría de flujo de células de bazo y médula ósea aisladas de animales tratados con Célula A como se analizó anteriormente, y cultivadas durante la noche con o sin rimiducid 10 nM.

La Figura 25 proporciona un mapa de plásmidos de SFG.iC9-2A-SLL.TCR.

35 Descripción detallada

Los receptores de células T recombinantes, específicos para un antígeno particular, se han utilizado para proporcionar especificidad a las células T y para proporcionar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en los pacientes. Ciertos métodos implican el uso de células T modificadas genéticamente que expresan una proteína específica de antígeno que tiene un dominio extracelular que se une a un antígeno.

45 La terapia de células T adoptiva, que utiliza células T modificadas genéticamente que expresan un receptor de células T heterólogo (TCR), puede proporcionar TCR específicos de células diana de alta avidez como parte del repertorio de células T del paciente. La terapia de células T adoptivas se ha utilizado para tratar enfermedades hiperproliferativas, que incluyen los tumores, al proporcionar una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Las células T se modifican genéticamente para generar linfocitos T con una especificidad definida, tal como, por ejemplo, especificidad por células tumorales. Los métodos de terapia de células T adoptivas se proporcionan como un esquema en la Figura 1. Como se discute en el presente documento, las células T aisladas de un repertorio de alo-HLA pueden proporcionar una mayor avidez por la diana, lo que es deseable para erradicar eficazmente los tumores. Las células T restringidas alo-HLA se comparan con las células T autorrestringidas en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Células T autorrestringidas	Células T restringidas alo-HLA
Los antígenos asociados a tumores/antígenos específicos de tejido son autopéptidos	Sin tolerancia a los autopéptidos presentados en el contexto de alo-HLA
Selección tímica: inducción de tolerancia a autopéptidos en el contexto de auto-HLA	Las células T reactivas alo-HLA derivadas in vivo son específicas de péptido Amir et al, Blood, 2011
Solo quedan células T de baja avidez: reactividad nula o baja contra los tumores	Las células T reactivas alo-HLA específicas de autopéptido exhiben una gran avidez

55 Por lo tanto, en algunos ejemplos se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica CDR3, en el que: el polinucleótido que codifica CDR3 codifica la región CDR3 de un receptor de células T que se une específicamente al antígeno expresado preferencialmente en melanoma (PRAME); el polinucleótido que codifica CDR3 comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende la región CDR3 de un polipéptido TCRα; el polinucleótido que codifica CDR3 comprende un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende la región CDR3 de un polipéptido TCRβ; y la región CDR3 del polipéptido TCRα y el polipéptido

TCR β juntos se unen específicamente a PRAME. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un receptor de células T. En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos primero o segundo, o primero y segundo, están optimizadas por codones; en algunas realizaciones, el primer o segundo polipéptido. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos del primer y segundo polipéptido, o del primer o segundo polipéptido se modifican con cisteína para aumentar la expresión del TCR recombinante. Por cisteína modificada se entiende que las secuencias de nucleótidos codifican polipéptidos que comprenden un residuo de cisteína adicional. Por codones optimizados se entiende que la secuencia de nucleótidos incluye codones que mejoran la expresión del polipéptido codificado. En el presente documento se presentan ejemplos de secuencias de nucleótidos con codones optimizados, sin embargo, se entiende que se pueden utilizar otras secuencias de nucleótidos que también codifiquen las regiones CDR3 proporcionadas en el presente documento, y que el término codones optimizados incluye secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos CDR3, que incluyen las regiones CDR3 de las cadenas alfa y beta de TCR en el presente documento, o derivados de las mismas que son un 90 % o más idénticas a las secuencias de polipéptidos proporcionadas en el presente documento. Al calcular la identidad de una secuencia de aminoácidos y un derivado de la secuencia de aminoácidos, la cisteína utilizada para potenciar la expresión del polipéptido TCR alfa o beta recombinante, o la región CDR3 u otro fragmento del mismo, no se considera parte del cálculo del porcentaje cuando la secuencia proporcionada en el presente documento como la SEQ ID NO: no tiene la modificación de cisteína.

En algunas realizaciones, la región CDR3 del receptor de células T se une específicamente a un polipéptido PRAME que comprende la secuencia de aminoácidos SLLQHLIGL. En algunos ejemplos, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; o el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, o derivados de la misma que tienen una secuencia de aminoácidos 90 % o más idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 26. En algunos ejemplos, el primer polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o un derivado de la misma, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, o un derivado de la misma; o el primer polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25, o un derivado de la misma que tiene nucleótidos consecutivos 90 % o más idénticos a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28, o un derivado de la misma que tiene nucleótidos consecutivos 90 % o más idénticos a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28.

En algunos ejemplos, la región CDR3 del receptor de células T se une específicamente a un polipéptido PRAME que comprende la secuencia de aminoácidos QLLALLPSL. En algunas realizaciones, el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48, que tiene una secuencia de aminoácidos 90 % o más idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 48. En algunas realizaciones, el primer polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47, o un derivado de la misma que tiene nucleótidos consecutivos 90 % o más idénticos a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47, y el segundo polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 50, o un derivado de la misma que tiene nucleótidos consecutivos 90 % o más idénticos a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 49 o SEQ ID NO: 50.

En algunas realizaciones, la región CDR3 del receptor de células T se une al PRAME humano. En algunas realizaciones, la región CDR3 del receptor de células T se une a PRAME en el contexto de la presentación HLA de clase I del MHC. En algunas realizaciones, la región CDR3 del receptor de células T se une específicamente a un complejo péptido-MHC, en el que la molécula de MHC es una molécula HLA Clase I de MHC y el péptido es un epítipo PRAME. En algunas realizaciones, la molécula de MHC es una molécula HLA A2.01 Clase I de MHC. En algunas realizaciones, el epítipo PRAME es SLLQHLIGL.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende además un promotor ligado operativamente al polinucleótido que codifica CDR3. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido Caspasa-9 quimérico que comprende una región de unión a ligando multimérico y un polipéptido Caspasa-9. En algunas realizaciones, se proporcionan células modificadas que se transfectan o transducen con los ácidos nucleicos de la presente solicitud que codifican la región CDR3 y el polipéptido Caspasa-9 quimérico. En algunas realizaciones, la célula modificada es una célula T.

También se proporcionan en algunas realizaciones vectores plasmídicos o virales que comprenden moléculas de ácido nucleico de la presente solicitud. En algunas realizaciones, se proporcionan células modificadas que se transfectan o transducen con una molécula de ácido nucleico de la presente solicitud. En algunas realizaciones, la célula comprende además una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido Caspasa-9 quimérico que comprende una región de unión a ligando multimérico y un polipéptido Caspasa-9. En algunas realizaciones, la célula modificada es una célula T.

También se proporcionan en algunas realizaciones composiciones farmacéuticas que comprenden una célula modificada de la presente solicitud, un ácido nucleico de la presente solicitud o un vector plasmídico o viral de la presente solicitud y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunos ejemplos se proporcionan métodos para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto diagnosticado con una enfermedad o afección hiperproliferativa, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula modificada de la presente solicitud. En algunas realizaciones, el sujeto tiene al menos un tumor y en el que el tamaño de al menos un tumor se reduce después de la administración de la célula modificada. En algunas realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en un diagnóstico de una afección o enfermedad seleccionada del grupo que consiste en sarcoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y neuroblastoma, melanoma, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de células renales, cáncer de mama, sarcoma, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y neuroblastoma.

En algunos ejemplos, se proporcionan métodos para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células a una población de células diana o tejido en un sujeto, que comprenden administrar una célula modificada de la presente solicitud al sujeto. En algunas realizaciones, el número o la concentración de células diana en el sujeto se reduce tras la administración de la célula modificada. Cuando, en algunos ejemplos, la célula modificada comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido Caspasa-9 quimérico, el método comprende además administrar al sujeto un ligando multimérico que se une a la región de unión del ligando multimérico después de la administración de las células modificadas al sujeto. En algunas realizaciones, la administración del ligando multimérico, el número o la concentración de células modificadas que comprenden el polipéptido quimérico Caspasa-9 se reduce en una muestra obtenida del sujeto después de administrar el ligando multimérico en comparación con el número o la concentración de células modificadas que comprenden el polipéptido caspasa-9 quimérico en una muestra obtenida del sujeto antes de administrar el ligando multimérico.

También se proporcionan en algunas realizaciones métodos in vitro para expresar un receptor de células T que se une específicamente a PRAME en una célula, que comprenden poner en contacto una molécula de ácido nucleico de la presente solicitud con una célula bajo condiciones en las que el ácido nucleico se incorpora a la célula, por lo que la célula expresa el receptor de células T del ácido nucleico incorporado.

Como se utiliza en el presente documento, el uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es coherente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. Aún más, los términos “que tiene”, “que incluye”, “que contiene” y “que comprende” son intercambiables y un experto en la técnica sabe que estos términos son términos abiertos.

El término “alogénico”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a loci HLA o MHC que son antígenicamente distintos entre las células huésped y donante.

Por tanto, las células o tejidos transferidos de la misma especie pueden ser antígenicamente distintos. Los ratones singénicos pueden diferir en uno o más loci (congénicos) y los ratones alogénicos pueden tener los mismos antecedentes.

El término “autólogo”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a loci HLA o MHC que no son antígenicamente distintos entre las células del huésped y las del donante, por ejemplo, donde las células del donante se obtienen del huésped.

El término “antígeno”, como se utiliza en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. Un antígeno puede derivarse de organismos, subunidades de proteínas/antígenos, células enteras destruidas o inactivadas o lisados. Organismos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, *Helicobacters*, *Campylobacters*, *Clostridia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, virus de la influenza, virus de la parainfluenza, virus respiratorio sincitial, *Borrelia burgdorfei*, *Plasmodium*, virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, virus del sarampión, rotavirus, shigella, *Salmonella typhi*, *Neisseria gonorrhoea*. Por lo tanto, cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos se pueden derivar de ADN genómico o recombinante. Cualquier ADN que contenga secuencias de nucleótidos o secuencias de nucleótidos parciales de un genoma patógeno o un gen o un fragmento de un gen para una proteína que provoca una respuesta inmunitaria da como resultado la síntesis de un antígeno. Además, los presentes métodos no se limitan al uso de la secuencia de ácidos nucleicos completa de un gen o genoma. Las presentes composiciones y métodos incluyen, pero no se limitan a, el uso de secuencias parciales de ácidos nucleicos de más de un gen o genoma y que estas secuencias de ácidos nucleicos estén dispuestas en varias combinaciones para provocar la respuesta inmunitaria deseada.

El término “célula presentadora de antígenos” es cualquiera de una variedad de células capaces de mostrar, adquirir o presentar al menos un antígeno o fragmento antigénico sobre (o en) su superficie celular. En general, el término “célula” puede ser cualquier célula que logre el objetivo de ayudar a potenciar una respuesta inmunitaria (es decir, de los brazos de células T o B del sistema inmunitario) contra un antígeno o una composición antigénica. Como se discutió en Kuby, 2000, *Immunology*, supp. 4th edition, W.H. Freeman y compañía, por ejemplo, y utilizado en el presente documento en ciertas realizaciones, una célula que muestra o presenta un antígeno normalmente o con una molécula de histocompatibilidad principal de clase II o complejo a una célula inmunitaria es una “célula presentadora de antígeno”. En ciertos aspectos, una célula (por ejemplo, una célula APC) puede fusionarse con otra célula, como una célula

recombinante o una célula tumoral que expresa el antígeno deseado. Los métodos para preparar una fusión de dos o más células se discuten, por ejemplo, en Goding, J.W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 65-66, 71-74 (Academic Press, 1986); Campbell, in: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden & Von Knippenberg, Amsterdam, Elsevier, pp. 75-83, 1984; Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975; Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976, Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977. En algunos casos, la célula inmunitaria a la que una célula muestra o presenta un antígeno es una célula TH CD4⁺. Las moléculas adicionales expresadas en APC u otras células inmunitarias pueden ayudar o mejorar la potenciación de una respuesta inmunitaria. Las moléculas secretadas o solubles, como por ejemplo, citocinas y adyuvantes, también pueden ayudar o potenciar la respuesta inmunitaria contra un antígeno. En el presente documento se discuten varios ejemplos.

Una "fracción de reconocimiento de antígeno" puede ser cualquier polipéptido o fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, un dominio variable de fragmento de anticuerpo, ya sea de origen natural o sintético, que se une a un antígeno. Los ejemplos de fracciones de reconocimiento de antígenos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos derivados de anticuerpos, tales como, por ejemplo, fragmentos variables de cadena única (scFv), fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; polipéptidos derivados de receptores de células T, tal como, por ejemplo, dominios variables de TCR; factores secretados (por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento) que pueden fusionarse artificialmente con dominios de señalización (por ejemplo, "zitocinas") y cualquier ligando o fragmento de receptor (por ejemplo, CD27, NKG2D) que se une a la proteína afín extracelular. Las bibliotecas combinatorias también se podrían utilizar para identificar péptidos que se unen con alta afinidad a dianas asociadas a tumores.

El término "autólogo" significa una célula, ácido nucleico, proteína, polipéptido o similar derivado del mismo individuo al que se administra posteriormente. Las células modificadas de los presentes métodos pueden, por ejemplo, ser células autólogas, tales como, por ejemplo, células T autólogas.

El término "cáncer" como se utiliza en el presente documento se define como una hiperproliferación de células cuya pérdida de rasgo único de controles normales da como resultado un crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de tejido local y metástasis. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, melanoma, pulmón de células no pequeñas, pulmón de células pequeñas, pulmón, hepatocarcinoma, leucemia, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, encía, lengua, neuroblastoma, cabeza, cuello, mama, páncreas, próstata, ojo, renal, ósea, testicular, ovárico, mesotelioma, cervical, gastrointestinal, linfoma, cerebro, colon, sarcoma o vejiga.

Los términos "célula", "estirpe celular" y "cultivo celular", como se utilizan en el presente documento, se pueden utilizar indistintamente. Todos estos términos también incluyen su progenie, que son todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas.

Como se utiliza en el presente documento, el término "ADNc" se refiere al ADN preparado utilizando ARN mensajero (ARNm) como plantilla. La ventaja de utilizar un ADNc, a diferencia del ADN genómico o el ADN polimerizado a partir de una plantilla de ARN genómico no procesado o parcialmente procesado, es que el ADNc contiene principalmente secuencias de codificación de la proteína correspondiente. Hay momentos en los que se utiliza la secuencia genómica completa o parcial, tal como cuando se requieren las regiones no codificantes para expresión óptima o cuando las regiones no codificantes, tal como los intrones, deben ser la diana de una estrategia antisentido.

Como se utiliza en el presente documento, el término "construcción de expresión" o "transgén" se define como cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica productos génicos en los que parte o la totalidad de la secuencia que codifica el ácido nucleico es capaz de transcribirse y puede insertarse en el vector. La transcripción se traduce en una proteína, pero no es necesario. En ciertas realizaciones, la expresión incluye tanto la transcripción de un gen como la traducción del ARNm en un producto génico. En otras realizaciones, la expresión solo incluye la transcripción del ácido nucleico que codifica los genes de interés. El término "construcción terapéutica" también se puede utilizar para referirse a la construcción de expresión o transgén. La construcción de expresión o el transgén se puede utilizar, por ejemplo, como una terapia para tratar enfermedades o trastornos hiperproliferativos, tal como cáncer, por lo que la construcción de expresión o el transgén es una construcción terapéutica o una construcción profiláctica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen luego en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refieren a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que también cumplen otras funciones y se describen más adelante.

Como se utiliza en el presente documento, el término "ex vivo" se refiere a "fuera" del cuerpo. Los términos "ex vivo" e "in vitro" se pueden utilizar de manera intercambiable en el presente documento.

Los receptores de células T (TCR) son proteínas inmunitarias que se unen específicamente a moléculas antigénicas. Los TCR están compuestos por dos polipéptidos diferentes que se encuentran sobre la superficie de las células T. Reconocen, o se unen específicamente a, antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad; al unirse al antígeno, la célula T se activa. Por “reconocer” se entiende, por ejemplo, que el receptor de células T, o fragmento o fragmentos del mismo, tal como el polipéptido TCR α y TCR β juntos, es capaz de contactar con el antígeno e identificarlo como una diana. Los TCR pueden comprender polipéptidos α y β , o cadenas. Los polipéptidos α y β incluyen dos dominios extracelulares, los dominios variable y constante. El dominio variable de los polipéptidos α y β tiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR); se considera que CDR3 es la principal CDR responsable de reconocer el epítipo. El polipéptido α incluye las regiones V y J, generadas por recombinación VJ, y el polipéptido β incluye las regiones V, D y J, generadas por recombinación VDJ. La intersección de las regiones VJ y las regiones VDJ corresponde a la región CDR3. Los TCR a menudo se nombran utilizando la nomenclatura TCR de International Immunogenetics (IMGT) (Base de datos IMGT, www.IMGT.org; Giudicelli, V., et al., IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences, Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006). PMID: 16381979; T cell Receptor Factsbook, LeFranc and LeFranc, Academic Press ISBN 0-12-441352-8).

Por “unirse específicamente a” en relación con un receptor de células T, o como se refiere a un receptor de células T recombinante, polipéptido, fragmento de polipéptido, variante o análogo, o una célula modificada, tal como, por ejemplo, los receptores de células T PRAME, las regiones CDR3 del receptor de células T y las células modificadas que expresan TCR de PRAME en el presente documento significan que el receptor de células T, o fragmento del mismo, reconoce o se une selectivamente al antígeno PRAME. Bajo ciertas condiciones, por ejemplo, en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo discutido en el presente documento, el receptor de células T se une a PRAME y no se une en una cantidad significativa a otros polipéptidos. Por lo tanto, el receptor de células T se une a PRAME con al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 veces más afinidad que a un polipéptido antigénico de control. Esta unión también se puede determinar indirectamente en el contexto de una célula T modificada que expresa un TCR de PRAME. En ensayos tales como, por ejemplo, un ensayo discutido en el presente documento, la célula T modificada es específicamente reactiva contra una estirpe celular, células o tejido que expresa PRAME, tal como, por ejemplo, células de mieloma, AML o ALL. Por lo tanto, la célula T que expresa TCR de PRAME se une a una estirpe celular que expresa PRAME con al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 veces más reactividad en comparación con su reactividad contra una estirpe celular de control que es no es una estirpe celular que expresa PRAME. Los receptores de células T PRAME, las regiones CDR3 del receptor de células T y las estirpes celulares que expresan TCR de PRAME pueden, por ejemplo, unirse a PRAME que se expresa en una superficie celular y, por lo general, unirse a PRAME en el contexto de la presentación del marcador principal de histocompatibilidad (MHC), por ejemplo, presentación HLA Clase I de MHC, por ejemplo, en el contexto de presentación HLA A2.01 Clase 1 de MHC.

Como se utiliza en el presente documento, el término “funcionalmente equivalente”, se refiere a un receptor de células T, por ejemplo, o como se refiere a un fragmento, variante o análogo de ácido nucleico del receptor de células T, se refiere a un ácido nucleico que codifica un receptor de células T o polipéptido receptor de células T, que estimula una respuesta inmunitaria contra un antígeno o una célula. En el contexto del reconocimiento o unión de TCR a un antígeno, el TCR puede reconocer el antígeno como un epítipo como parte de un complejo péptido-MHC. “Funcionalmente equivalente” o “un fragmento funcional” de un polipéptido receptor de células T se refiere, por ejemplo, a un receptor de células T que carece de un dominio receptor de células T, como una región constante, pero que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria típica para una célula T. Un fragmento de receptor de células T funcionalmente equivalente puede, por ejemplo, unirse específicamente a un antígeno o reconocerlo, solo o en un complejo MHC, y tras la unión o el reconocimiento, activa el linfocito T. Los derivados de moléculas de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican, por ejemplo, regiones CDR3 de un TCR, o de un polipéptido TCR alfa o un polipéptido TCR beta son moléculas de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican regiones CDR3 funcionales de TCR o de TCR alfa o polipéptidos beta y, por ejemplo, codifican polipéptidos que se unen específicamente a un antígeno o lo reconocen, solos o en un complejo MHC. Estos derivados de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos TCR alfa o TCR beta pueden, por ejemplo, tener nucleótidos consecutivos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más idénticos a la secuencia de nucleótidos correspondiente que codifica los polipéptidos TCR alfa o TCR beta. “Funcionalmente equivalente” o “un fragmento funcional” de una región CDR3 de un polipéptido receptor de células T se refiere, por ejemplo, a un receptor de células T que puede tener una secuencia de aminoácidos modificada y puede, por ejemplo, tener una secuencia de aminoácidos de los polipéptidos alfa o beta, o los polipéptidos alfa y beta que son 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más idénticos a los polipéptidos alfa y beta correspondientes, pero que pueden estimular una respuesta inmunitaria típica de una célula T cuando se incluyen como parte de un receptor de células T, tal como un receptor de células T recombinante. Al calcular la identidad de una secuencia de aminoácidos y un derivado de la secuencia de aminoácidos, o una secuencia de nucleótidos, la cisteína utilizada para potenciar la expresión del polipéptido TCR alfa o beta recombinante, o la región CDR3 u otro fragmento del mismo, o el codón que codifica el residuo de cisteína, no se considera como parte del cálculo del porcentaje cuando la secuencia proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: no tiene la modificación de cisteína. Cuando el término “funcionalmente equivalente” o “fragmento funcional del mismo” se aplica a otros ácidos nucleicos o polipéptidos, tal como, por ejemplo, Caspasa-9 o Caspasa-9 truncada, se refiere a fragmentos, variantes y similares que tienen la actividad igual o similar a la de los polipéptidos de referencia de los métodos del presente documento. Por ejemplo, un fragmento funcional de un polipéptido de antígeno tumoral, tal como, por ejemplo, PSMA puede ser antigénico, permitiendo que se produzcan anticuerpos que reconozcan el antígeno tumoral particular. Un fragmento funcional de una región de unión a ligando, por ejemplo, Fvls, incluiría una porción suficiente del polipéptido de la región de unión a ligando para unir el ligando apropiado. “Funcionalmente equivalente” se refiere, por ejemplo, a un

polipéptido coestimulador que carece del dominio extracelular, pero que es capaz de amplificar la respuesta de destrucción de tumores mediada por células T cuando se expresa en células T.

5 El término “enfermedad hiperproliferativa” se define como una enfermedad que resulta de una hiperproliferación de células. Enfermedades hiperproliferativas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cáncer o enfermedades autoinmunitarias. Otras enfermedades hiperproliferativas pueden incluir oclusión vascular, reestenosis, aterosclerosis o enfermedad inflamatoria intestinal.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término “gen” se define como una proteína funcional, un polipéptido o una unidad codificadora de péptido. Como se entenderá, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos génicos más pequeños que expresan, o están adaptados para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes.

15 El término “composición inmunogénica” o “inmunógeno” se refiere a una sustancia que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de inmunógenos incluyen, por ejemplo, antígenos, autoantígenos que desempeñan una función en la inducción de enfermedades autoinmunitarias y antígenos asociados a tumores expresados sobre células cancerosas.

20 El término “inmunocomprometido”, como se utiliza en el presente documento, se define como un sujeto que tiene un sistema inmunitario reducido o debilitado. La condición inmunocomprometida puede deberse a un defecto o disfunción del sistema inmunitario o a otros factores que aumentan la susceptibilidad a infecciones y/o enfermedades. Aunque tal categorización permite una base conceptual para la evaluación, las personas inmunodeprimidas a menudo no encajan completamente en un grupo u otro. Puede verse afectado más de un defecto en los mecanismos de defensa del organismo. Por ejemplo, las personas con un defecto específico de los linfocitos T causado por el VIH también pueden tener neutropenia causada por los fármacos utilizados para la terapia antiviral o estar inmunocomprometidos debido a una ruptura de la integridad de la piel y las membranas mucosas. Un estado inmunocomprometido puede resultar de las líneas centrales permanentes u otros tipos de deterioro debido al abuso de fármacos por vía intravenosa; o ser causado por malignidad secundaria, desnutrición o haber sido infectado con otros agentes infecciosos tal como tuberculosis o enfermedades de transmisión sexual, por ejemplo, sífilis o hepatitis.

30 Como se utiliza en el presente documento, el término “farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable” se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran a un animal o a un humano.

35 Como se utiliza en el presente documento, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células presentados en el presente documento, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar a las composiciones ingredientes activos suplementarios. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

45 Como se utiliza en el presente documento, el término “polinucleótido” se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos como se utilizan en el presente documento son intercambiables. Los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los “nucleótidos” monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se utilizan en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácidos nucleicos que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, que incluyen, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácidos nucleicos de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando tecnología de clonación ordinaria y PCR™, y similares, y por medios sintéticos. Además, los polinucleótidos incluyen mutaciones de los polinucleótidos, incluyen pero no se limitan a mutaciones de los nucleótidos o nucleósidos por métodos bien conocidos en la técnica. Un ácido nucleico puede comprender uno o más polinucleótidos.

50 Como se utiliza en el presente documento, el término “polipéptido” se define como una cadena de residuos de aminoácidos, que usualmente tiene una secuencia definida. Como se utiliza en el presente documento, el término polipéptido puede ser intercambiable con el término “proteínas”.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término “promotor” se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen.

65 Como se utiliza en el presente documento, los términos “regular una respuesta inmunitaria”, “modular una respuesta inmunitaria” o “controlar una respuesta inmunitaria”, se refieren a la capacidad de modificar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la composición es capaz de potenciar y/o activar la respuesta inmunitaria. Además aún, la composición también es capaz de inhibir la respuesta inmunitaria. La forma de regulación está determinada por el ligando que se utiliza con la composición. Por ejemplo, un análogo dimérico de la sustancia química da como resultado la dimerización del polipéptido

coestimulante que conduce a la activación de la célula T; sin embargo, un análogo monomérico de la sustancia química no da como resultado la dimerización del polipéptido coestimulante, que no activaría las células T.

Los términos “transfección” y “transducción” son intercambiables y se refieren al proceso mediante el cual se introduce una secuencia de ADN exógena en una célula huésped eucariótica. La transfección (o transducción) se puede lograr mediante cualquiera de varios medios que incluyen electroporación, microinyección, suministro de pistola de genes, infección retroviral, lipofección, superfección y similares.

Como se utiliza en el presente documento, el término “singénico” se refiere a células, tejidos o animales que tienen genotipos que son idénticos o están lo suficientemente relacionados como para permitir el trasplante de tejido, o son inmunológicamente compatibles. Por ejemplo, gemelos idénticos o animales de la misma cepa endogámica. Singénico e isogénico se pueden utilizar indistintamente.

Los términos “paciente” o “sujeto” son intercambiables y, como se utilizan en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, un organismo o animal; un mamífero, que incluye, por ejemplo, un primate humano, no humano (por ejemplo, mono), ratón, cerdo, vaca, cabra, conejo, rata, conejillo de indias, hámster, caballo, mono, oveja u otro mamífero no humano; un no mamífero, que incluye, por ejemplo, un vertebrado no mamífero, tal como un pájaro (por ejemplo, un pollo o un pato) o un pez, y un invertebrado no mamífero.

Como se utiliza en el presente documento, el término “vacuna” se refiere a una formulación que contiene una composición presentada en el presente documento que está en una forma que se puede administrar a un animal. Normalmente, la vacuna comprende un medio de solución salina o acuosa tamponada convencional en el que se suspende o disuelve la composición. De esta forma, la composición se puede utilizar convenientemente para prevenir, mejorar o tratar de otro modo una afección. Tras la introducción en un sujeto, la vacuna puede provocar una respuesta inmunitaria que incluye, pero no se limita a, la producción de anticuerpos, citocinas y/u otras respuestas celulares.

Como se utiliza en el presente documento, el término “bajo control transcripcional” o “ligado operativamente” se define como que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con el ácido nucleico para controlar la iniciación de la ARN polimerasa y la expresión del gen.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratar”, “tratado” o “que trata” se refieren a profilaxis y/o terapia. Cuando se utiliza con respecto a un tumor sólido, tal como un tumor sólido canceroso, por ejemplo, el término se refiere a la prevención mediante tratamiento profiláctico, que aumenta la resistencia del sujeto a tumores sólidos o cáncer. En algunos ejemplos, el sujeto puede ser tratado para prevenir el cáncer, donde el cáncer es familiar o está genéticamente asociado. Cuando se utiliza con respecto a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, el término se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a la infección con un patógeno o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto se infecte con el patógeno o mostrará signos de enfermedad atribuibles a la infección, así como un tratamiento después de que el sujeto se haya infectado para combatir la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o evitar que empeore.

Los métodos proporcionados en el presente documento se pueden utilizar, por ejemplo, para tratar una enfermedad, trastorno o afección en la que existe una expresión elevada de un antígeno tumoral.

Como se utiliza en el presente documento, el término “vacuna” se refiere a una formulación que contiene una composición presentada en el presente documento que está en una forma que se puede administrar a un animal. Normalmente, la vacuna comprende un medio de solución salina o acuosa tamponada convencional en el que se suspende o disuelve la composición. De esta forma, la composición se puede utilizar convenientemente para prevenir, mejorar o tratar de otro modo una afección. Tras la introducción en un sujeto, la vacuna puede provocar una respuesta inmunitaria que incluye, pero no se limita a, la producción de anticuerpos, citocinas y/u otras respuestas celulares.

Enfermedad de la sangre: Los términos “enfermedad sanguínea”, “enfermedad de la sangre” y/o “enfermedades de la sangre”, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a afecciones que afectan la producción de sangre y sus componentes, que incluyen, pero no se limitan a, células sanguíneas, hemoglobina, proteínas sanguíneas, el mecanismo de coagulación, producción de sangre, producción de proteínas sanguíneas, similares y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de enfermedades de la sangre incluyen anemias, leucemias, linfomas, neoplasmas hematológicos, albuminurias, hemofilias y similares.

Enfermedad de la médula ósea: El término “enfermedad de la médula ósea”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a afecciones que conducen a una disminución en la producción de células sanguíneas y plaquetas sanguíneas. En algunas enfermedades de la médula ósea, la arquitectura normal de la médula ósea puede verse desplazada por infecciones (por ejemplo, tuberculosis) o neoplasias malignas, lo que a su vez puede conducir a la disminución de la producción de células sanguíneas y plaquetas sanguíneas. Los ejemplos no limitantes de enfermedades de la médula ósea incluyen leucemias, infecciones bacterianas (por ejemplo, tuberculosis), enfermedad por radiación o envenenamiento, apnecitopenia, anemia, mieloma múltiple y similares.

Células T y células T activadas (CD3⁺): Las células T (también denominadas linfocitos T) pertenecen a un grupo de glóbulos blancos denominados linfocitos. Los linfocitos generalmente están involucrados en la inmunidad mediada por células. La "T" en "células T" se refiere a células derivadas o cuya maduración está influenciada por el timo. Las células T se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, tales como las células B y las células Destructoras Naturales (NK), por la presencia de proteínas en la superficie celular conocidas como receptores de células T. El término "células T activadas", como se utiliza en el presente documento, se refiere a las células T que han sido estimuladas para producir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, expansión clonal de células T activadas) mediante el reconocimiento de un determinante antigénico presentado en el contexto de un marcador de histocompatibilidad mayor de Clase II (MHC). Las células T se activan por la presencia de un determinante antigénico, citocinas y/o linfoquinas y un grupo de proteínas de superficie celular de diferenciación (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, similares y combinaciones de los mismos). A menudo se dice que las células que expresan un grupo de proteínas diferenciales son "positivas" para la expresión de esa proteína sobre la superficie de las células T (por ejemplo, las células positivas para la expresión de CD3 o CD4 se denominan células CD3⁺ o CD4⁺). Las proteínas CD3 y CD4 son receptores o correceptores de la superficie celular que pueden estar directa y/o indirectamente involucrados en la transducción de señales en las células T.

Sangre periférica: El término "sangre periférica", como se utiliza en el presente documento, se refiere a los componentes celulares de la sangre (por ejemplo, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), que se obtienen o preparan a partir de la sangre circulante y no secuestrados dentro del sistema linfático, bazo, hígado o médula ósea.

Sangre del cordón umbilical: La sangre del cordón umbilical es distinta de la sangre periférica y la sangre secuestrada dentro del sistema linfático, el bazo, el hígado o la médula ósea. Los términos "sangre del cordón umbilical", "sangre umbilical" o "sangre del cordón", que se pueden utilizar indistintamente, se refieren a la sangre que permanece en la placenta y en el cordón umbilical adherido después del parto. La sangre del cordón a menudo contiene células madre, que incluyen células hematopoyéticas.

Por "obtenido o preparado" como, por ejemplo, en el caso de las células, se entiende que las células o el cultivo celular se aíslan, purifican o purifican parcialmente de la fuente, donde la fuente puede ser, por ejemplo, la sangre del cordón umbilical, médula ósea o sangre periférica. Los términos también pueden aplicarse al caso en el que la fuente original, o un cultivo celular, haya sido cultivado y las células se hayan replicado, y en el que las células de la progenie se deriven ahora de la fuente original.

Por "destruir" o "que destruye" como en un porcentaje de células destruidas, se entiende la muerte de una célula por apoptosis, según se mide utilizando cualquier método conocido para medir la apoptosis. El término también se puede referir a la ablación celular.

Célula T donante: El término "célula T donante", como se utiliza en el presente documento, se refiere a las células T que a menudo se administran a un receptor para conferir inmunidad antiviral y/o antitumoral después del trasplante alogénico de células madre. Las células T donantes a menudo se utilizan para inhibir el rechazo del injerto de médula y aumentar el éxito del aloinjerto; sin embargo, las mismas células T donantes pueden causar una respuesta aloagresiva contra los antígenos del huésped, lo que a su vez puede provocar la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD). Ciertas células T activadas del donante pueden causar una respuesta de GvHD más alta o más baja que otras células T activadas. Las células T donantes también pueden ser reactivas contra las células tumorales del receptor, provocando un efecto beneficioso de injerto contra tumor.

Las variantes conservadoras de la función son proteínas o enzimas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado sin alterar la conformación general y la función de la proteína o enzima, que incluye, pero no se limita a, el reemplazo de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, que incluye el carácter polar o no polar, tamaño, forma y carga. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos para muchos de los aminoácidos comúnmente conocidos no codificados genéticamente son bien conocidas en la técnica. Las sustituciones conservadoras de otros aminoácidos no codificados se pueden determinar en base a sus propiedades físicas en comparación con las propiedades de los aminoácidos codificados genéticamente.

Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima, de tal manera que el porcentaje de similitud de la secuencia de proteínas o aminoácidos entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos el 90 % y, por ejemplo, al menos el 95 %, determinado de acuerdo con un esquema de alineación. Como se menciona en el presente documento, "similitud de secuencia" significa el grado en que se relacionan las secuencias de nucleótidos o proteínas. El grado de similitud entre dos secuencias puede basarse en el porcentaje de identidad y/o conservación de la secuencia. "Identidad de secuencia" en el presente documento significa el grado en que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos son invariantes. "Alineación de secuencias" significa el proceso de alinear dos o más secuencias para lograr niveles máximos de identidad (y, en el caso de secuencias de aminoácidos, conservación) con el fin de valorar el grado de similitud. Se conocen en la técnica numerosos métodos para alinear secuencias y valorar la similitud/identidad, tales como, por ejemplo, el método de agrupación, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN, así como en BLASTN, BLASTP y FASTA. Al utilizar cualquiera de estos programas, los ajustes utilizados son los que dan como resultado la mayor similitud de secuencia.

Célula mesenquimatosa del estroma: Los términos “célula mesenquimatosa del estroma” o “célula mesenquimatosa del estroma derivada de la médula ósea”, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a células madre multipotentes que pueden diferenciarse ex vivo, in vitro e in vivo en adipocitos, osteoblastos y condroblastos, y pueden definirse adicionalmente como una fracción de células mononucleares de la médula ósea que se adhieren a placas de cultivo de plástico en condiciones de cultivo estándar, que son negativas para marcadores de linaje hematopoyético y son positivas para CD73, CD90 y CD105.

Célula madre pluripotente inducible: Los términos “célula madre pluripotente inducible” o “célula madre pluripotente inducida” como se utilizan en el presente documento se refieren a células adultas o diferenciadas que son “reprogramadas” o inducidas por manipulación genética (por ejemplo, expresión de genes que a su vez activan la pluripotencialidad), biológica (por ejemplo, virus de tratamiento o retrovirus) y/o química (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos y similares) para generar células que son capaces de diferenciarse en muchos, si no todos, tipos de células, como células madre embrionarias. Las células madre pluripotentes inducibles se distinguen de las células madre embrionarias en que alcanzan un estado de diferenciación intermedia o terminal (por ejemplo, células de la piel, células óseas, fibroblastos y similares) y luego son inducidas a desdiferenciarse, recuperando de esta manera parte o la totalidad de la capacidad para generar células multipotentes o pluripotentes.

Célula CD34⁺: El término “célula CD34⁺”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que expresa la proteína CD34 sobre su superficie celular. “CD34”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una glicoproteína de superficie celular (por ejemplo, proteína de sialomucina) que a menudo actúa como un factor de adhesión célula-célula y está involucrada en la entrada de células T en los ganglios linfáticos, y es miembro de la familia de genes del “grupo de diferenciación”. CD34 también puede mediar en la unión de las células madre a la médula ósea, la matriz extracelular o directamente a las células del estroma. Las células CD34⁺ a menudo se encuentran en el cordón umbilical y la médula ósea como células hematopoyéticas, un subconjunto de células madre mesenquimales, células progenitoras endoteliales, células endoteliales de vasos sanguíneos pero no linfáticos (excepto linfáticos pleurales), mastocitos, una subpoblación de células dendríticas (que son negativas al factor XIIIa) en el intersticio y alrededor de los anexos de la dermis de la piel, así como células en ciertos tumores de tejidos blandos (por ejemplo, sarcoma alveolar de partes blandas, leucemia linfoblástica aguda pre-B (Pre-B-ALL), leucemia mielógena aguda (AML), AML-M7, dermatofibrosarcoma protuberans, tumores del estroma gastrointestinal, fibroblastoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Kaposi, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumores malignos de la vaina nerviosa periférica, hemangiopericitomas menígeos, meningiomas, neurofibromas, schwannomas y carcinoma papilar de tiroides).

Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) se refieren a las células T que tienen varios receptores que se infiltran en los tumores y matan las células tumorales de forma específica. La regulación de la actividad de los TIL utilizando los métodos de la presente solicitud permitiría un control más directo de la eliminación de células tumorales.

Vector de expresión génica: Los términos “vector de expresión génica”, “vector de expresión de ácido nucleico” o “vector de expresión” como se utilizan en el presente documento, que se pueden utilizar indistintamente en todo el documento, generalmente se refieren a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido, un fago, una secuencia de replicación autónoma (ARS), cromosoma artificial, cromosoma artificial de levadura (por ejemplo, YAC)) que puede replicarse en una célula huésped y utilizarse para introducir un gen o genes en una célula huésped. Los genes introducidos en el vector de expresión pueden ser genes endógenos (por ejemplo, un gen que normalmente se encuentra en la célula u organismo huésped) o genes heterólogos (por ejemplo, genes que normalmente no se encuentran en el genoma o en los ácidos nucleicos extracromosómicos de la célula u organismo huésped). Los genes introducidos en una célula por un vector de expresión pueden ser genes nativos o genes que han sido modificados o manipulados por ingeniería. El vector de expresión génica también se puede diseñar para que contenga secuencias reguladoras no traducidas en 5' y 3' que a veces pueden funcionar como secuencias potenciadoras, regiones promotoras y/o secuencias terminadoras que pueden facilitar o potenciar la transcripción eficiente del gen o genes transportados sobre el vector de expresión. A veces, un vector de expresión génica también se diseña para la funcionalidad de replicación y/o expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) en un tipo de célula, ubicación de célula o tipo de tejido particular. Los vectores de expresión a veces incluyen un marcador seleccionable para el mantenimiento del vector en la célula huésped o receptora.

Promotor regulado por el desarrollo: El término “promotor regulado por el desarrollo” como se utiliza en el presente documento se refiere a un promotor que actúa como el sitio de unión inicial para la ARN polimerasa para transcribir un gen que se expresa bajo ciertas condiciones que están controladas, iniciadas o influenciadas por un programa o ruta de desarrollo. Los promotores regulados por el desarrollo a menudo tienen regiones de control adicionales en o cerca de la región promotora para unirse a activadores o represores de la transcripción que pueden influir en la transcripción de un gen que forma parte de un programa o ruta de desarrollo. Los promotores regulados por el desarrollo a veces están involucrados en la transcripción de genes cuyos productos génicos influyen en la diferenciación del desarrollo de las células.

Células diferenciadas en el desarrollo: El término “células diferenciadas en el desarrollo”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a células que han experimentado un proceso, que a menudo implica la expresión de genes específicos regulados por el desarrollo, por el cual la célula evoluciona de una forma menos especializada a una forma más especializada para realizar una función específica. Los ejemplos no limitantes de células diferenciadas en el desarrollo son células hepáticas, células pulmonares, células cutáneas, células nerviosas, células sanguíneas y similares.

- Los cambios en la diferenciación del desarrollo generalmente implican cambios en la expresión génica (por ejemplo, cambios en los patrones de expresión génica), reorganización genética (por ejemplo, remodelación o cromatina para ocultar o exponer genes que serán silenciados o expresados, respectivamente) y ocasionalmente implican cambios en secuencias de ADN (por ejemplo, diferenciación por diversidad inmunitaria). La diferenciación celular durante el desarrollo puede entenderse como el resultado de una red reguladora de genes. Un gen regulador y sus módulos reguladores en cis son nodos en una red reguladora de genes que reciben entrada (por ejemplo, proteína expresada en dirección ascendente en una ruta o programa de desarrollo) y crean una salida en otra parte de la red (por ejemplo, el producto génico expresado actúa sobre otros genes en dirección descendente en la ruta o programa de desarrollo).
- 5 El término “enfermedad hiperproliferativa” se define como una enfermedad que resulta de una hiperproliferación de células. Ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen, pero no se limitan a, cáncer o enfermedades autoinmunitarias. Otras enfermedades hiperproliferativas pueden incluir oclusión vascular, reestenosis, aterosclerosis o enfermedad inflamatoria intestinal.
- 10 En algunas realizaciones, el ácido nucleico está contenido dentro de un vector viral. En ciertas realizaciones, el vector viral es un vector adenoviral o un vector retroviral o lentiviral. Se entiende que en algunas realizaciones, la célula se pone en contacto con el vector viral ex vivo, y en algunas realizaciones, la célula se pone en contacto con el vector viral in vivo.
- 15 En ciertas realizaciones, la célula también se pone en contacto con un antígeno. A menudo, la célula se pone en contacto con el antígeno ex vivo. A veces, la célula se pone en contacto con el antígeno in vivo. En algunas realizaciones, la célula está en un sujeto y se genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno. A veces, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos (CTL). En ocasiones, la respuesta inmunitaria se genera frente a un antígeno tumoral. En ciertas realizaciones, la célula se activa sin la adición de un adyuvante.
- 20 En algunas realizaciones, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo y se administra al sujeto mediante administración intradérmica. En algunas realizaciones, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo y se administra al sujeto mediante administración subcutánea. A veces, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo. A veces, la célula se transduce con el ácido nucleico in vivo.
- 25 La célula en algunas realizaciones se pone en contacto con un antígeno, a veces ex vivo. En ciertas realizaciones, la célula está en un sujeto y se genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno, tal como una respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos (CTL). En ciertas realizaciones, se genera una respuesta inmunitaria contra un antígeno tumoral (por ejemplo, PSMA). En algunas realizaciones, el ácido nucleico se prepara ex vivo y se administra al sujeto por administración intradérmica o por administración subcutánea, por ejemplo. A veces, la célula se transduce o transfecta con el ácido nucleico ex vivo o in vivo.
- 30 En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende una secuencia promotora ligada operativamente a la secuencia de polinucleótidos. Alternativamente, el ácido nucleico comprende un ARN transcrito ex vivo, que contiene la región codificante de proteína de la proteína quimérica.
- 35 Por “reducir el tamaño del tumor” o “inhibir el crecimiento del tumor” de un tumor sólido se entiende una respuesta al tratamiento, o la estabilización de la enfermedad, de acuerdo con las pautas estándar, tal como, por ejemplo, los criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST). Por ejemplo, esto puede incluir una reducción en el diámetro de un tumor sólido de aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, o la reducción en el número de tumores, células tumorales circulantes o marcadores tumorales, de aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %. El tamaño de los tumores se puede analizar mediante cualquier método, que incluye, por ejemplo, exploración por CT, MRI, por ejemplo, MRI por CT, radiografía de tórax (para tumores de pulmón) o formación de imágenes moleculares, por ejemplo, exploración por PET, tal como, por ejemplo, una exploración por PET tras la administración de un PSA marcado con yodo 123, por ejemplo, ligando de PSMA, tal como, por ejemplo, donde el inhibidor es TROFEX™/MIP-1072/1095, o formación de imágenes moleculares, por ejemplo, SPECT, o una exploración por PET utilizando PSA, por ejemplo, anticuerpo PSMA, tal como, por ejemplo, capromad pendetide (Prostascint), un anticuerpo PSMA marcado con 111-iridio.
- 40 Por “reducir, ralentizar o inhibir la vascularización tumoral” se entiende una reducción de la vascularización tumoral de aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %, o una reducción en la aparición de vasculatura nueva de aproximadamente 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, cuando se compara con la cantidad de vascularización del tumor antes del tratamiento. La reducción se puede referir a un tumor, o puede ser una suma o un promedio de la vascularización en más de un tumor. Los métodos para medir la vascularización del tumor incluyen, por ejemplo, exploración CAT, MRI, por ejemplo, CT-MRI, o formación de imágenes moleculares, por ejemplo, SPECT, o una exploración por PET, tal como, por ejemplo, una exploración por PET después de administrar PSA marcado con yodo 123, por ejemplo, ligando de PSMA, tal como, por ejemplo, donde el inhibidor es TROFEX™/MIP-1072/1095, o una exploración por PET utilizando PSA, por ejemplo, anticuerpo PSMA, tal como, por ejemplo, capromad pendetide (Prostascint), un anticuerpo PSMA marcado con 111-iridio.
- 55 Un tumor se clasifica o nombra como parte de un órgano, tal como un tumor de cáncer de próstata cuando, por ejemplo, el tumor está presente en la glándula prostática, o se ha derivado de o ha hecho metástasis a partir de un tumor en la
- 60

glándula prostática, o produce PSA. Un tumor ha hecho metástasis a partir de un tumor en la glándula prostática cuando, por ejemplo, se determina que el tumor tiene puntos de ruptura cromosómicos que son iguales o similares a un tumor en la glándula prostática del sujeto.

5 Para neoplasias malignas hematológicas, por "reducir, ralentizar o inhibir una neoplasia maligna hematológica" se entiende una reducción, ralentización o inhibición de la cantidad o concentración de células malignas, por ejemplo, medidas en una muestra obtenida del sujeto, de aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, cuando se compara con la cantidad o concentración de células malignas antes del tratamiento. Los métodos para medir la cantidad o concentración de células malignas, o la carga tumoral incluyen, por ejemplo, qRT-PCR y secuenciación del genoma completo.

10 Para tumores hematológicos, por "reducir, ralentizar o inhibir una carga tumoral" se entiende una reducción, ralentización o inhibición de la cantidad o concentración de células tumorales, por ejemplo, medidas en una muestra obtenida del sujeto, de aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, cuando se compara con la cantidad o concentración de células tumorales antes del tratamiento. Los métodos para medir la cantidad o concentración de células tumorales incluyen, por ejemplo, qRT-PCR y secuenciación del genoma completo.

Construcciones de expresión diseñadas por ingeniería

20 Las construcciones de expresión que expresan los presentes TCR o polipéptidos quiméricos comprenden la región codificante del TCR o polipéptido y una secuencia promotora, todos ligados operativamente. En general, el término "ligado operativamente" pretende indicar que la secuencia promotora está ligada funcionalmente a una segunda secuencia, en la que la secuencia promotora inicia y media la transcripción del ADN correspondiente a la segunda secuencia.

25 En ciertos ejemplos, el polinucleótido que codifica el TCR u otro polipéptido se incluye en el mismo vector, tal como, por ejemplo, un vector vírico o plasmídico, como un polinucleótido que codifica el segundo polipéptido. Este segundo polipéptido puede ser, por ejemplo, un polipéptido de caspasa, como se discute en el presente documento, o un polipéptido marcador. En estos ejemplos, la construcción se puede diseñar con un promotor ligado operativamente a un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica los dos polipéptidos, ligado por un polipéptido 2A escindible o por la secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES). En estos ejemplos, el primero y segundo polipéptidos se separan durante la traducción, dando como resultado un TCR y un polipéptido adicional. En otros ejemplos, los dos polipéptidos se pueden expresar por separado del mismo vector, donde cada ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica uno de los polipéptidos se liga operativamente a un promotor separado. En todavía otros ejemplos, un promotor puede ligarse operativamente a los dos polinucleótidos, dirigiendo la producción de dos transcritos de ARN separados y, por lo tanto, dos polipéptidos; en un ejemplo, el promotor puede ser bidireccional y las regiones codificantes pueden estar en direcciones opuestas 5'-3'. Por lo tanto, las construcciones de expresión discutidas en el presente documento pueden comprender al menos uno o al menos dos promotores.

40 En todavía otros ejemplos, dos polipéptidos, tales como, por ejemplo, el TCR y un polipéptido de caspasa se pueden expresar por la célula utilizando dos vectores separados. Las células pueden cotransfectarse o cotransformarse con los vectores, o los vectores pueden introducirse en las células en momentos diferentes.

45 Los polipéptidos pueden variar en su orden, desde el terminal amino hasta el terminal carboxi. El orden de los diversos dominios se puede ensayar utilizando métodos como, por ejemplo, los que se discuten en el presente documento, para obtener la expresión y la actividad óptimas.

Marcadores seleccionables

50 En ciertas realizaciones, las construcciones de expresión contienen construcciones de ácido nucleico cuya expresión se identifica in vitro o in vivo al incluir un marcador en la construcción de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula que permitiría una fácil identificación de las células que contienen la construcción de expresión. Usualmente, la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación y en la selección de transformantes. Por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Alternativamente, se emplean enzimas tales como la timidina quinasa (tk) del Virus del Herpes Simple. También se pueden emplear marcadores de superficie inmunológicos que contienen los dominios extracelulares que no son de señalización o varias proteínas (por ejemplo, CD34, CD19, receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR)), lo que permite un método sencillo para la clasificación mediada por anticuerpos magnéticos o fluorescentes. No se considera que el marcador de selección empleado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Ejemplos adicionales de marcadores seleccionables incluyen, por ejemplo, indicadores como GFP, EGFP, β -gal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). En ciertas realizaciones, la proteína marcadora, tal como, por ejemplo, CD19, se utiliza para la selección de células para transfusión, tal como, por ejemplo, en la selección inmunomagnética. Como se discute en el presente documento, un marcador de CD19 se distingue de un anticuerpo anti-CD19 o, por ejemplo, un scFv, TCR u otra fracción de reconocimiento de antígeno que se une a CD19.

En ciertas realizaciones, el polipéptido marcador se une a la molécula de señalización quimérica inducible. Por ejemplo, el polipéptido marcador puede ligarse a la molécula de señalización quimérica inducible a través de una secuencia de polipéptidos, tal como, por ejemplo, una secuencia escindible de tipo 2A. El polipéptido marcador puede ser, por ejemplo, CD19, Δ CD19, o puede ser, por ejemplo, una proteína heteróloga, seleccionada para no afectar la actividad de la molécula de señalización quimérica inducible.

Las secuencias similares a 2A, o secuencias 2A de "faltas de enlaces peptídicos", se derivan, por ejemplo, de muchos virus diferentes, que incluyen, por ejemplo, de *Thosea asigna*. Estas secuencias a veces también se conocen como "secuencias de faltas de péptidos". Cuando este tipo de secuencia se coloca dentro de un cistrón, entre dos péptidos que se pretenden separar, el ribosoma parece omitir un enlace de péptidos, en el caso de la secuencia *Thosea asigna*; se omite el enlace entre los aminoácidos Gly y Pro en el terminal carboxi "P-G-P". Esto deja de dos a tres polipéptidos, en este caso la región citoplásmica del polipéptido coestimulante y el polipéptido marcador. Cuando se utiliza esta secuencia, el péptido que está codificado en 5' de la secuencia 2A puede terminar con aminoácidos adicionales en el terminal carboxi, que incluyen el residuo Gly y cualquier residuo en dirección ascendente en la secuencia 2A. El péptido que está codificado en 3' de la secuencia 2A puede terminar con aminoácidos adicionales en el terminal amino, que incluyen el residuo Pro y cualquier residuo en dirección descendente que siga a la secuencia 2A.

En algunas realizaciones, se puede incluir un polipéptido en el vector de expresión para ayudar en la clasificación de las células. Por ejemplo, el epítipo mínimo de CD34 puede incorporarse al vector. En algunas realizaciones, los vectores de expresión utilizados para expresar los TCR proporcionados en el presente documento comprenden además un polinucleótido que codifica el epítipo mínimo de CD34 de 16 aminoácidos. En algunas realizaciones, como ciertas realizaciones proporcionadas en los ejemplos del presente documento, el epítipo mínimo de CD34 se incorpora en la posición amino terminal del tallo de CD8.

Regiones de unión a ligandos

Las regiones de unión a ligandos se pueden incluir en los polipéptidos quiméricos discutidos en el presente documento, por ejemplo, como parte de los polipéptidos de caspasa inducibles. El dominio de unión al ligando ("dimerización") de la construcción de expresión puede ser cualquier dominio conveniente que permita la inducción utilizando un ligando natural o no natural, por ejemplo, un ligando sintético no natural. La región de multimerización o el dominio de unión al ligando puede ser interno o externo a la membrana celular, dependiendo de la naturaleza de la construcción y la elección del ligando. Se conoce una amplia variedad de proteínas de unión a ligandos, que incluyen los receptores, que incluyen las proteínas de unión a ligandos asociadas con las regiones citoplásmicas indicadas anteriormente. Como se utiliza en el presente documento, el término "dominio de unión a ligando" puede intercambiarse con el término "receptor". De particular interés son las proteínas de unión a ligandos para las que se conocen o se pueden producir fácilmente ligandos (por ejemplo, ligandos orgánicos pequeños). Estos dominios o receptores de unión a ligandos incluyen los FKBP y los receptores de ciclofilina, los receptores de esteroides, el receptor de tetraciclina, los otros receptores indicados anteriormente y similares, así como los receptores "no naturales", que se pueden obtener a partir de anticuerpos, particularmente los receptores pesados o subunidad de cadena ligera, secuencias mutadas de las mismas, secuencias aleatorias de aminoácidos obtenidas mediante procedimientos estocásticos, síntesis combinatorias y similares. En ciertas realizaciones, la región de unión al ligando se selecciona del grupo que consiste en la región de unión al ligando de FKBP, la región de unión al ligando del receptor de ciclofilina, la región de unión al ligando del receptor de esteroides, la región de unión al ligando de los receptores de ciclofilina y la región de unión al ligando del receptor de tetraciclina. A menudo, la región de unión al ligando comprende una secuencia $F_v F_{vis}$. A veces, la secuencia $F_v F_{vis}$ comprende además una secuencia F_v' adicional. La región FKBP12 puede tener, por ejemplo, una sustitución de aminoácido en la posición 36, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina y alanina. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, aquellos discutidos en Kopytek, S.J., et al., *Chemistry & Biology* 7:313-321 (2000) y en Gestwicki, J.E., et al., *Combinatorial Chem. & High Throughput Screening* 10:667-675 (2007); Clackson, T. (2006) *Chem Biol Drug Des* 67:440-2; Clackson, T., in *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design* (Schreiber, s., et al., eds., Wiley, 2007)). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 77 representa un ejemplo de una secuencia en la que hay una sustitución de aminoácido de valina en la posición 36 (proporcionada como el 35^{avo} aminoácido en la secuencia de este documento). Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 84 representa una secuencia de aminoácidos para FKBP12 que tiene una fenilalanina de tipo silvestre en la posición 36 (proporcionada como el 35^{avo} aminoácido en la secuencia de este documento).

En su mayor parte, los dominios de unión a ligandos o los dominios receptores tendrán al menos aproximadamente 50 aminoácidos y menos de aproximadamente 350 aminoácidos, usualmente menos de 200 aminoácidos, ya sea como dominio natural o porción activa truncada del mismo. El dominio de unión puede, por ejemplo, ser pequeño (<25 kDa, para permitir una transfección eficiente en vectores virales), monomérico, no inmunogénico, tener ligandos no tóxicos, permeables a las células, accesibles sintéticamente que pueden configurarse para la dimerización.

El dominio del receptor puede ser intracelular o extracelular dependiendo del diseño de la construcción de expresión y la disponibilidad de un ligando apropiado. Para los ligandos hidrófobos, el dominio de unión puede estar a ambos lados de la membrana, pero para los ligandos hidrófilos, particularmente los ligandos de proteínas, el dominio de unión suele ser externo a la membrana celular, a menos que exista un sistema de transporte para internalizar el ligando en una forma en el que está disponible para unión. Para un receptor intracelular, la construcción puede codificar un péptido señal y un

dominio transmembrana 5' o 3' de la secuencia del dominio receptor o puede tener una secuencia señal de unión a lípidos 5' de la secuencia del dominio receptor. Cuando el dominio receptor está entre el péptido señal y el dominio transmembrana, el dominio receptor será extracelular.

5 La porción de la construcción de expresión que codifica el receptor puede someterse a mutagénesis por diversas razones. La proteína mutagenizada puede proporcionar una mayor afinidad de unión, permitir la discriminación por el ligando del receptor de origen natural y el receptor mutagenizado, proporcionar oportunidades para diseñar un par receptor-ligando, o similares. El cambio en el receptor puede implicar cambios en los aminoácidos que se sabe que están en el sitio de unión, mutagénesis aleatoria utilizando técnicas combinatorias, donde los codones para los aminoácidos asociados con el sitio de unión u otros aminoácidos asociados con cambios conformacionales pueden estar sujetos a mutagénesis al cambiar el(los) codón(es) para el aminoácido particular, ya sea con cambios conocidos o aleatorios, expresar las proteínas resultantes en un huésped procariótico apropiado y luego seleccionando las proteínas resultantes para la unión.

15 os anticuerpos y subunidades de anticuerpos, por ejemplo, cadena pesada o ligera, particularmente fragmentos, más particularmente toda o parte de la región variable, o fusiones de cadena pesada y ligera para crear unión de alta afinidad, se pueden utilizar como dominio de unión. Los anticuerpos que se contemplan incluyen los que son un producto humano expresado ectópicamente, tales como un dominio extracelular que no desencadenaría una respuesta inmunitaria y generalmente no se expresa en la periferia (es decir, fuera del área del SNC/cerebro). Dichos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR) y proteínas de superficie embrionaria (es decir, antígeno carcinoembrionario).

25 Aún más, los anticuerpos se pueden preparar contra moléculas hapténicas, que son fisiológicamente aceptables, y las subunidades de anticuerpos individuales se pueden cribar en cuanto a la afinidad de unión. El ADNc que codifica las subunidades se puede aislar y modificar mediante supresión de la región constante, porciones de la región variable, mutagénesis de la región variable o similares, para obtener un dominio de proteína de unión que tenga la afinidad adecuada para el ligando. De esta forma, casi cualquier compuesto hapténico fisiológicamente aceptable se puede emplear como ligando o para proporcionar un epítipo para el ligando. En lugar de unidades de anticuerpo, se pueden emplear receptores naturales, en los que se conoce el dominio de unión y existe un ligando útil para la unión.

30 Oligomerización

La señal transducida normalmente resultará de la oligomerización mediada por ligando de las moléculas de proteína quimérica, es decir, como resultado de la oligomerización después de la unión del ligando, aunque se pueden emplear otros eventos de unión, por ejemplo, activación alostérica, para iniciar una señal. La construcción de la proteína quimérica variará en cuanto al orden de los diversos dominios y el número de repeticiones de un dominio individual.

40 Para multimerizar el polipéptido de caspasa-9, el ligando para los dominios de unión a ligandos/dominios receptores de los polipéptidos de caspasa-9 inducibles quiméricos usualmente será multimérico en el sentido de que tendrá al menos dos sitios de unión, con cada uno de los sitios de unión capaz de unirse al dominio del receptor del ligando. Por "región de unión a ligando multimérico" se entiende una región de unión a ligando que se une a un ligando multimérico. El término "ligandos multiméricos" incluye ligandos diméricos. Un ligando dimérico tendrá dos sitios de unión capaces de unirse al dominio del receptor del ligando. Deseablemente, los ligandos en cuestión serán un dímero o un oligómero de orden superior, usualmente no mayor que aproximadamente tetramero, de pequeñas moléculas orgánicas sintéticas, las moléculas individuales normalmente tienen al menos aproximadamente 150 Da y menos de aproximadamente 5 kDa, generalmente menos de aproximadamente 3 kDa. Se puede emplear una variedad de pares de ligandos y receptores sintéticos. Por ejemplo, en realizaciones que involucran receptores naturales, se puede utilizar FK506 dimérico con un receptor FKBP12, se puede utilizar ciclosporina A dimerizada con el receptor de ciclofilina, estrógeno dimerizado con un receptor de estrógeno, glucocorticoides dimerizados con un receptor de glucocorticoides, tetraciclina dimerizada con el receptor de tetraciclina, vitamina D dimerizada con el receptor de vitamina D, y similares. Alternativamente, se pueden utilizar órdenes más altos de los ligandos, por ejemplo, triméricos. Para las realizaciones que implican receptores no naturales, por ejemplo, subunidades de anticuerpos, subunidades de anticuerpos modificadas, anticuerpos de cadena sencilla compuestos por regiones variables de cadena ligera y pesada en tándem, separadas por un dominio ligador flexible, o receptores modificados y secuencias mutadas de los mismos, y similares, se puede utilizar cualquiera de una gran variedad de compuestos. Una característica significativa de estas unidades de ligando es que cada sitio de unión puede unirse al receptor con alta afinidad y pueden dimerizarse químicamente. También, hay métodos disponibles para equilibrar la hidrofobicidad/hidrofiliidad de los ligandos de tal manera que puedan disolverse en el suero a niveles funcionales, pero difundirse a través de las membranas plasmáticas para la mayoría de las aplicaciones.

60 En ciertas realizaciones, los presentes métodos utilizan la técnica de dimerización inducida químicamente (CID) para producir una proteína o polipéptido condicionalmente controlado. Además de ser inducible, esta técnica también es reversible, debido a la degradación del agente dimerizante lábil o a la administración de un inhibidor competitivo monomérico.

65 El sistema CID utiliza ligandos bivalentes sintéticos para entrecruzar rápidamente moléculas de señalización que se fusionan con dominios de unión a ligandos. Este sistema se ha utilizado para desencadenar la oligomerización y activación de la superficie celular (Spencer, D. M., et al., Science, 1993. 262: p. 1019-1024; Spencer D. M. et al., Curr Biol 1996,

6:839-847; Blau, C. A. et al., Proc Natl Acad.Sci. USA 1997, 94:3076-3081), o proteínas citosólicas (Luo, Z. et al., Nature 1996,383:181-185; MacCorkle, R. A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:3655-3660), el reclutamiento de factores de transcripción a elementos de ADN para modular la transcripción (Ho, S. N. et al., Nature 1996, 382:822-826; Rivera, V. M. et al., Nat.Med. 1996, 2:1028-1032) o el reclutamiento de moléculas de señalización a la membrana plasmática para estimular la señalización (Spencer D. M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1995, 92:9805-9809; Holsinger, L. J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1995, 95:9810-9814).

El sistema CID se basa en la noción de que la agregación de receptores de superficie activa efectivamente las cascadas de señalización en dirección descendente. En la realización más simple, el sistema CID utiliza un análogo dimérico del fármaco inmunosupresor permeable a los lípidos, FK506, que pierde su bioactividad normal mientras adquiere la capacidad de entrecruzar moléculas fusionadas genéticamente con la proteína de unión a FK506, FKBP12. Al fusionar una o más FKBP y una secuencia de miristoilación con el dominio de señalización citoplasmático de un receptor diana, se puede estimular la señalización de una manera dependiente del fármaco dimerizador, pero independiente del ligando y del ectodominio. Esto proporciona al sistema control temporal, reversibilidad utilizando análogos de fármacos monoméricos y especificidad potenciada. La alta afinidad de los CID AP20187/AP1903 de tercera generación por su dominio de unión, FKBP12, permite la activación específica del receptor recombinante in vivo sin la inducción de efectos secundarios no específicos a través de FKBP12 endógeno. También se puede utilizar variantes de FKBP12 que tienen sustituciones y supresiones de aminoácidos, tales como FKBP12₃₆, que se une a un fármaco dimerizador. Además, los ligandos sintéticos son resistentes a la degradación de la proteasa, lo que los hace más eficientes en la activación de los receptores in vivo que la mayoría de los agentes proteicos suministrados.

Los ligandos utilizados son capaces de unirse a dos o más de los dominios de unión a ligandos. Las proteínas quiméricas pueden unirse a más de un ligando cuando contienen más de un dominio de unión a ligando. El ligando es normalmente una no proteína o un producto químico. Ligandos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, FK506 dimérico (por ejemplo, FK1012).

Otras regiones de unión a ligandos pueden ser, por ejemplo, regiones diméricas o regiones de unión a ligandos modificadas con una sustitución oscilante, tal como, por ejemplo, FKBP12(V36): La proteína de unión a FK506 humana de 12 kDa con una sustitución de F36 a V, la secuencia de codificación madura completa (aminoácidos 1-107), proporciona un sitio de unión para el fármaco dimerizador sintético AP1903 (Jemal, A. et al., CA Cancer J. Clinic. 58, 71-96 (2008); Scher, H.I. and Kelly, W.K., Journal of Clinical Oncology 11, 1566-72 (1993)). También se pueden utilizar dos copias en tándem de la proteína en la construcción para que AP1903 induzca oligómeros de orden superior tras el entrecruzamiento.

F36V'-FKBP: F36V'-FKBP es una versión oscilante de codones de F36V-FKBP. Codifica la secuencia de polipéptidos idéntica a F36V-FKBP pero tiene solo un 62 % de homología a nivel de nucleótidos. F36V'-FKBP se diseñó para reducir la recombinación en vectores retrovirales (Schellhammer, P.F. et al., J. Urol. 157, 1731-5 (1997)). F36V'-FKBP se construyó mediante un procedimiento de ensamble de PCR. El transgén contiene una copia de F36V'-FKBP ligada directamente a una copia de F36V-FKBP.

En algunas realizaciones, el ligando es una molécula pequeña. Se puede seleccionar el ligando apropiado para la región de unión a ligando seleccionada. A menudo, el ligando es dimérico, a veces, el ligando es un FK506 dimérico o un análogo de FK506 dimérico. En ciertas realizaciones, el ligando es AP1903 (INN: rimiducid, Nombre en el Índice CAS: Ácido 2-piperidinacarboxílico, 1-[(2S)-1-oxo-2-(3,4,5-trimetoxifenil)butil]-,1,2-etanodiolbis [imino(2-oxo-2,1-etanodiol)oxi-3,1-fenileno[(1R)-3-(3,4-dimetoxifenil)propilideno]] éster, [2S-[1(R*),2R*[S*[S*[1(R*),2R*]]]]-(9CI), Número de registro CAS: 195514-63-7; Fórmula molecular: C₇₈H₉₈N₄O₂₀ Peso molecular: 1411.65). En ciertas realizaciones, el ligando es AP20187. En ciertas realizaciones, el ligando es un análogo de AP20187, tal como, por ejemplo, AP1510. En algunas realizaciones, ciertos análogos serán apropiados para FKBP12 y ciertos análogos apropiados para la versión mutante (V36) de FKBP12. En ciertas realizaciones, se incluye una región de unión a ligando en la proteína quimérica. En otras realizaciones, se incluyen dos o más regiones de unión a ligandos. Donde, por ejemplo, la región de unión al ligando es FKBP12, donde se incluyen dos de estas regiones, una puede ser, por ejemplo, la versión oscilante.

Otros sistemas de dimerización contemplados incluyen el sistema de cumermicina/ADN girasa B. La dimerización inducida por cuermicina activa una proteína Raf modificada y estimula la cascada de MAP quinasa. Véase Farrar et al., 1996.

AP1903 API es fabricado por Alphora Research Inc. y el Producto de Fármaco AP1903 para Inyección es fabricado por AAI Pharma Services Corp. Está formulado como una solución de 5 mg/ml de AP1903 en una solución al 25 % del solubilizante no iónico Solutol HS 15 (250 mg/ml, BASF). A temperatura ambiente, esta formulación es una solución transparente. Tras la refrigeración, esta formulación experimenta una transición de fase reversible en el almacenamiento prolongado, lo que da como resultado una solución lechosa. Esta transición de fase se invierte al volver a calentar a temperatura ambiente. El relleno es de 8 ml en un vial de vidrio de 10 ml (~40 mg de AP1903 para inyección total por vial).

Para uso, el AP1903 se calentará a temperatura ambiente y se diluirá antes de administración. Para sujetos de más de 50 kg, el AP1903 se administra a través de infusión i.v. a una dosis de 40 mg diluidos en 100 ml de solución salina fisiológica durante 2 horas a una tasa de 50 ml por hora utilizando una bolsa de solución salina sin DEHP y un equipo de solución. Los sujetos de menos de 50 kg reciben 0.4 mg/kg de AP1903.

Todos los medicamentos del estudio se mantienen a una temperatura de entre 2 grados C y 8 grados C, protegidos de la luz y el calor excesivos, y almacenados en un área cerrada con llave y de acceso restringido.

Al determinar la necesidad de administrar AP1903 y activar la caspasa-9 para inducir la apoptosis de las células T que expresan TCR manipuladas, a los pacientes se les puede administrar, por ejemplo, una dosis fija única de AP1903 para inyección (0.4 mg/kg) a través de infusión IV durante 2 horas, utilizando un equipo de infusión esterilizado sin DEHP ni óxido de etileno. La dosis de AP1903 se calcula individualmente para todos los pacientes y no se vuelve a calcular a menos que el peso corporal fluctúe en $\geq 10\%$. La dosis calculada se diluye en 100 ml de solución salina normal al 0.9 % antes de la infusión.

En un estudio de Fase I anterior de AP1903, 24 voluntarios sanos se trataron con dosis únicas de AP1903 para inyección a niveles de dosis de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/kg infundidos IV durante 2 horas. Los niveles plasmáticos de AP1903 fueron directamente proporcionales a la dosis, con valores medios de C_{max} que varían entre aproximadamente 10 y 1275 ng/ml en el rango de dosis de 0.01 a 1.0 mg/kg. Después del período de infusión inicial, las concentraciones en sangre demostraron una fase de distribución rápida, con niveles plasmáticos reducidos a aproximadamente 18, 7 y 1 % de la concentración máxima a las 0.5, 2 y 10 horas después de la dosis, respectivamente. Se mostró que AP1903 para inyección es seguro y bien tolerado en todos los niveles de dosis y demostró un perfil farmacocinético favorable. Iulucci JD, et al., J Clin Pharmacol. 41: 870-9, 2001.

La dosis fija de AP1903 para inyección utilizada, por ejemplo, puede ser de 0.4 mg/kg por infusión intravenosa durante 2 horas. La cantidad de AP1903 necesaria in vitro para la señalización eficaz de las células es de aproximadamente 10 - 100 nM (MW: 1412 Da). Esto equivale a 14 - 140 μ g/L o ~ 0.014 - 0.14 mg/kg (1.4-140 μ g/kg). La dosificación puede variar de acuerdo con la aplicación y, en ciertos ejemplos, puede estar más en el rango de 0.1 a 10 nM, o en el rango de 50 a 150 nM, 10 a 200 nM, 75 a 125 nM, 100 a 500 nM, 100-600 nM, 100-700 nM, 100-800 nM o 100-900 nM. Las dosis de hasta 1 mg/kg fueron bien toleradas en el estudio de Fase I de AP1903 descrito anteriormente.

Dirección a la membrana

Una secuencia dirigida a la membrana proporciona el transporte de la proteína quimérica a la membrana de la superficie celular, donde la misma u otras secuencias pueden codificar la unión de la proteína quimérica a la membrana de la superficie celular. Las moléculas en asociación con las membranas celulares contienen ciertas regiones que facilitan la asociación con la membrana, y dichas regiones se pueden incorporar en una molécula de proteína quimérica para generar moléculas dirigidas a la membrana. Por ejemplo, algunas proteínas contienen secuencias en el terminal N o terminal C que están aciladas y estas fracciones acilo facilitan la asociación con la membrana. Dichas secuencias son reconocidas por aciltransferasas y, a menudo, se ajustan a un motivo de secuencia particular. Ciertos motivos de acilación se pueden modificar con una sola fracción acilo (a menudo seguido de varios residuos cargados positivamente (por ejemplo, c-Src humana: M-G-S-N-K-S-K-P-K-D-A-S-Q-R-R-R) para mejorar la asociación con grupos de cabeza de lípidos aniónicos) y otros se pueden modificar con múltiples fracciones acilo. Por ejemplo, la secuencia de terminal N de la proteína tirosina quinasa Src puede comprender una sola fracción de miristoilo. Las regiones de acilación dual están ubicadas dentro de las regiones de terminales N de ciertas proteínas quinasas, tal como un subconjunto de miembros de la familia Src (por ejemplo, Yes, Fyn, Lck) y subunidades alfa de proteína G. Dichas regiones de acilación dual a menudo se ubican dentro de los primeros dieciocho aminoácidos de dichas proteínas y se ajustan al motivo de secuencia Met-Gly-Cys-Xaa-Cys, donde Met se escinde, Gly está N-acilado y uno de los residuos Cys está S-acilado. El Gly a menudo está miristoilado y un Cys puede estar palmitoilado. Regiones de acilación que se ajustan al motivo de secuencia Cys-Ala-Ala-Xaa (las denominadas "cajas CAAX"), que se pueden modificar con fracciones de isoprenilo C15 o C10, desde el terminal C de las subunidades gamma de la proteína G y otras proteínas (por ejemplo, también se puede utilizar la dirección World Wide Web ebi.ac.uk/interpro/DisplayproEntry?ac=IPR001230). Estos y otros motivos de acilación incluyen, por ejemplo, los discutidos en Gauthier-Campbell et al., Molecular Biology of the Cell 15: 2205-2217 (2004); Glabati et al., Biochem. J. 303: 697-700 (1994) y Zlakine et al., J. Cell Science 110: 673-679 (1997), y se pueden incorporar en moléculas quiméricas para inducir la localización en la membrana. En ciertas realizaciones, una secuencia nativa de una proteína que contiene un motivo de acilación se incorpora a una proteína quimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una porción de terminal N de Lck, Fyn o Yes o una subunidad alfa de proteína G, tal como los primeros veinticinco aminoácidos de terminales o menos de dichas proteínas (por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 10 a aproximadamente 19 aminoácidos, o aproximadamente 15 a aproximadamente 19 aminoácidos de la secuencia nativa con mutaciones opcionales), se pueden incorporar dentro del terminal de terminal N de una proteína quimérica. En ciertas realizaciones, una secuencia de terminal C de aproximadamente 25 aminoácidos o menos de una subunidad gamma de proteína G que contiene una secuencia de motivo de caja CAAX (por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 10 a aproximadamente 18 aminoácidos, o aproximadamente 15 a aproximadamente 18 aminoácidos de la secuencia nativa con mutaciones opcionales) se pueden ligar al terminal C de una proteína quimérica.

En algunas realizaciones, una fracción acilo tiene un valor de log p de +1 a +6 y, a veces, tiene un valor de log p de +3 a +4.5. Los valores de log p son una medida de la hidrofobicidad y, a menudo, se derivan de estudios de partición de octanol/agua, en los que las moléculas con mayor hidrofobicidad se dividen en octanol con mayor frecuencia y se caracterizan por tener un valor de log p más alto. Los valores de log p se publican para una serie de moléculas lipofílicas

y los valores de log p se pueden calcular utilizando procesos de partición conocidos (por ejemplo, Chemical Reviews, Vol. 71, Issue 6, página 599, donde la entrada 4493 muestra ácido láurico con un valor de log p de 4.2). Cualquier fracción acilo se puede ligar a una composición peptídica discutida anteriormente y probar su actividad antimicrobiana utilizando métodos conocidos y aquellos discutidos a continuación. La fracción acilo a veces es un alquilo C1-C20, alquienilo C2-C20, alquinilo C2-C20, cicloalquilo C3-C6, haloalquilo C1-C4, cicloalquilalquilo C4-C12, arilo, arilo sustituido o arilo alquilo (C1-C4), por ejemplo. Cualquier fracción que contiene acilo a veces es un ácido graso, y ejemplos de fracciones de ácidos grasos son fracciones de propilo (C3), butilo (C4), pentilo (C5), hexilo (C6), heptilo (C7), octilo (C8), nonilo (C9), decilo (C10), undecilo (C11), laurilo (C12), miristilo (C14), palmitilo (C16), estearilo (C18), araquidilo (C20), behenilo (C22) y lignocerilo (C24), y cada fracción puede contener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 insaturaciones (es decir, dobles enlaces). Una fracción acilo a veces es una molécula lipídica, como un lípido fosfatidílico (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, fosfatidil etanolamina, fosfatidilcolina), esfingolípido (por ejemplo, shingomielina, esfingosina, ceramida, gangliósido, cerebroside) o versiones modificadas de las mismas. En ciertas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o cinco o más fracciones acilo están ligados a una región de asociación de membrana. Se puede emplear cualquier secuencia dirigida a la membrana que sea funcional en el huésped y que pueda o no estar asociada con uno de los otros dominios de la proteína quimérica. En algunas realizaciones, tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencia dirigida a miristoilación, secuencia dirigida a palmitoilación, secuencias de prenilación (es decir, farnesilación, geranyl-geranilación, caja CAAX), motivos de interacción proteína-proteína o secuencias transmembrana (que utilizan péptidos señal) de los receptores. Los ejemplos incluyen aquellos discutidos en, por ejemplo, diez Klooster JP et al, *Biology of the Cell* (2007) 99, 1-12, Vincent, S., et al., *Nature Biotechnology* 21:936-40, 1098 (2003).

Existen dominios de proteínas adicionales que pueden aumentar la retención de proteínas en varias membranas. Por ejemplo, un dominio de homología de pleckstrin (PH) de ~120 aminoácidos se encuentra en más de 200 proteínas humanas que normalmente están involucradas en la señalización intracelular. Los dominios PH pueden unirse a varios lípidos de fosfatidilinositol (PI) dentro de las membranas (por ejemplo, PI (3,4,5)-P3, PI (3,4)-P2, PI (4,5)-P2) y, por lo tanto, desempeñar una función clave en reclutar proteínas a diferentes membranas o compartimentos celulares. A menudo, el estado de fosforilación de los lípidos PI está regulado, tal como, por la cinasa PI-3 o PTEN y, por lo tanto, la interacción de las membranas con los dominios PH no es tan estable como con los lípidos acilados.

Regiones de control

1. Promotores

No se considera que el promotor particular empleado para controlar la expresión de una secuencia de polinucleótidos de interés sea importante, siempre que sea capaz de dirigir la expresión del polinucleótido en la célula diana. Por lo tanto, cuando una célula humana se dirige a la región que codifica la secuencia de polinucleótidos se puede, por ejemplo, colocar junto a y bajo el control de un promotor que es capaz de expresarse en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir un promotor humano o viral.

En diversas realizaciones, el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano del SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, la β -actina, el promotor de la insulina de rata y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se pueden utilizar para obtener un alto nivel de expresión de la secuencia codificante de interés. También se contempla el uso de otros promotores de fagos bacterianos o celulares virales o de mamíferos que son bien conocidos en la técnica para lograr la expresión de una secuencia codificante de interés, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para un propósito dado. Al emplear un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés después de la transfección o transformación.

La selección de un promotor que se regula en respuesta a señales fisiológicas o sintéticas específicas puede permitir la expresión inducible del producto génico. Por ejemplo, en el caso de que la expresión de un transgén, o transgenes cuando se utiliza un vector multicistrónico, sea tóxica para las células en las que se produce el vector, es deseable prohibir o reducir la expresión de uno o más de los transgenes. Ejemplos de transgenes que son tóxicos para la estirpe celular productora son los genes proapoptóticos y de citocinas. Varios sistemas de promotores inducibles están disponibles para la producción de vectores virales donde los productos transgénicos son tóxicos (adición en más promotores inducibles).

El sistema de ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, CA) es uno de dichos sistemas. Este sistema está diseñado para permitir la expresión regulada de un gen de interés en células de mamífero. Consiste en un mecanismo de expresión estrechamente regulado que prácticamente no permite la expresión del nivel basal del transgén, pero sí una inducibilidad de más de 200 veces. El sistema se basa en el receptor de ecdisona heterodimérico de *Drosophila*, y cuando la ecdisona o un análogo tal como la muristerona A se une al receptor, el receptor activa un promotor para activar la expresión del transgén en dirección descendente se alcanzan altos niveles de transcripciones de ARNm. En este sistema, ambos monómeros del receptor heterodimérico se expresan constitutivamente a partir de un vector, mientras que el promotor sensible a la ecdisona, que dirige la expresión del gen de interés, se encuentra en otro plásmido. Por lo tanto, sería útil la ingeniería de este tipo de sistema en el vector de transferencia de genes de interés. La cotransfección de plásmidos que contienen el gen de interés y los monómeros del receptor en la estirpe celular productora permitiría entonces la producción del vector de transferencia de genes sin la expresión de un transgén potencialmente tóxico. En el momento adecuado, la expresión del transgén podría activarse con ecdisona o muristerona A.

Otro sistema inducible que puede resultar útil es el sistema Tet-Off™ o Tet-On™ (Clontech, Palo Alto, CA) desarrollado originalmente por Gossen and Bujard (Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992; Gossen et al., Science, 268:1766-1769, 1995). Este sistema también permite regular altos niveles de expresión génica en respuesta a tetraciclina o derivados de tetraciclina tales como doxiciclina. En el sistema Tet-On™, la expresión génica se activa en presencia de doxiciclina, mientras que en el sistema Tet-Off™, la expresión génica se activa en ausencia de doxiciclina. Estos sistemas se basan en dos elementos reguladores derivados del operón de resistencia a la tetraciclina de E. coli. La secuencia del operador de tetraciclina a la que se une el represor de tetraciclina y la proteína represora de tetraciclina. El gen de interés se clona en un plásmido detrás de un promotor que tiene presentes elementos sensibles a la tetraciclina. Un segundo plásmido contiene un elemento regulador denominado transactivador controlado por tetraciclina, que está compuesto, en el sistema Tet-Off™, del dominio VP16 del virus del herpes simple y el represor de tetraciclina de tipo silvestre. Por tanto, en ausencia de doxiciclina, la transcripción está constitutivamente activada. En el sistema Tet-On™, el represor de tetraciclina no es de tipo silvestre y en presencia de doxiciclina activa la transcripción. Para la producción de vectores de terapia génica, el sistema Tet-Off™ se puede utilizar para que las células productoras puedan crecer en presencia de tetraciclina o doxiciclina y evitar la expresión de un transgén potencialmente tóxico, pero cuando el vector se introduce en el paciente, la expresión génica estaría activada constitutivamente.

En algunas circunstancias, es deseable regular la expresión de un transgén en un vector de terapia génica. Por ejemplo, se utilizan diferentes promotores virales con distintas intensidades de actividad dependiendo del nivel de expresión deseado. En células de mamífero, el promotor temprano inmediato de CMV se utiliza a menudo para proporcionar una fuerte activación transcripcional. El promotor CMV se revisa en Donnelly, J.J., et al., 1997. Annu. Rev. Immunol. 15:617-48. También se han utilizado versiones modificadas del promotor de CMV que son menos potentes cuando se desean niveles reducidos de expresión del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas, a menudo se utilizan promotores retrovirales tales como los LTR de MLV o MMTV. Otros promotores virales que se utilizan dependiendo del efecto deseado incluyen SV40, RSV LTR, HIV-1 y HIV-2 LTR, promotores de adenovirus como los de la región E1A, E2A o MLP, AAV LTR, HSV-TK y virus del sarcoma aviar.

De manera similar, los promotores específicos de tejido se utilizan para efectuar la transcripción en tejidos o células específicos para reducir la toxicidad potencial o los efectos indeseables en tejidos no diana. Estos promotores pueden dar como resultado una expresión reducida en comparación con un promotor más fuerte tal como el promotor de CMV, pero también pueden dar como resultado una expresión e inmunogenicidad más limitadas. (Bojak, A., et al., 2002. Vaccine. 20:1975-79; Cazeaux, N., et al., 2002. Vaccine 20:3322-31). Por ejemplo, los promotores específicos de tejido tales como el promotor asociado a PSA o la calicreína glandular específica de la próstata, o el gen de la creatina quinasa muscular se pueden utilizar cuando sea apropiado.

Los ejemplos de promotores específicos de tejido o específicos de diferenciación incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: B29/CD79b (células B); CD14 (células monocíticas); CD43 (leucocitos y plaquetas); CD45 (células hematopoyéticas); CD68 (macrófagos); desmina (músculo); elastasa-1 (células acinares pancreáticas); endogлина (células endoteliales); fibronectina (células diferenciadoras, tejidos curativos); y Flt-1 (células endoteliales); GFAP (astrocitos).

En ciertas indicaciones, es deseable activar la transcripción en momentos específicos después de la administración del vector de terapia génica. Esto se hace con dichos promotores como aquellos que son regulables por hormonas o citocinas. Los promotores de respuesta a citocinas y proteínas inflamatorias que se pueden utilizar incluyen cininógeno K y T (Kageyama et al., (1987) J. Biol. Chem., 262,2345-2351), c-fos, TNF- α , proteína C reactiva (Arcone, et al., (1988) Nucl. Acids Res., 16(8), 3195-3207), haptoglobina (Oliviero et al., (1987) EMBO J., 6, 1905-1912), amiloide sérico A2, C/EBP α , IL-1, IL-6 (Poli and Cortese, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86,8202-8206), Complemento C3 (Wilson et al., (1990) Mol. Cell. Biol., 6181-6191), IL-8, glicoproteína ácida α -1 (Prowse and Baumann, (1988) Mol Cell Biol, 8,42-51), α -1 antitripsina, lipoproteína lipasa (Zechner et al., Mol. Cell. Biol., 2394-2401, 1988), angiotensinógeno (Ron, et al., (1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895), fibrinógeno, c-jun (inducible por ésteres de forbol, TNF- α , radiación UV, ácido retinoico y peróxido de hidrógeno), collagenasa (inducida por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (inducible por metales pesados y glucocorticoides), estromelina (inducible por éster de forbol, interleucina-1 y EGF), macroglobulina α -2 y antiqumotripsina α -1. Otros promotores incluyen, por ejemplo, SV40, MMTV, Virus de Inmunodeficiencia Humana (MV), virus de Moloney, ALV, virus de Epstein Barr, virus del sarcoma de Rous, actina humana, miosina, hemoglobina y creatina.

Se prevé que cualquiera de los promotores anteriores solo o en combinación con otro puede ser útil dependiendo de la acción deseada. Los promotores y otros elementos reguladores se seleccionan de tal manera que sean funcionales en las células o tejidos deseados. Además, esta lista de promotores no se debe interpretar como exhaustiva o limitativa; otros promotores que se utilizan junto con los promotores y métodos divulgados en el presente documento.

2. Potenciadores

Los potenciadores son elementos genéticos que aumentan la transcripción de un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Los primeros ejemplos incluyen los potenciadores asociados con la inmunoglobulina y los receptores de células T que flanquean la secuencia de codificación y ocurren dentro de varios intrones. Muchos promotores virales, tales como CMV, SV40 y LTR retrovirales, están estrechamente asociados con la

actividad potenciadora y, a menudo, se tratan como elementos únicos. Los potenciadores están organizados de manera muy similar a los promotores. Es decir, se componen de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se une a una o más proteínas transcripcionales. La distinción básica entre potenciadores y promotores es operativa. Una región potenciadora en su conjunto estimula la transcripción a distancia y, a menudo, independientemente de la orientación; esto no tiene por qué ser cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor tiene uno o más elementos que dirigen la iniciación de la síntesis de ARN en un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y los potenciadores a menudo se superponen y son contiguos, y a menudo parecen tener una organización modular muy similar. Un subconjunto de potenciadores incluye regiones de control de locus (LCR) que no solo pueden aumentar la actividad transcripcional, sino que (junto con los elementos aislantes) también pueden ayudar a aislar el elemento transcripcional de las secuencias adyacentes cuando se integran en el genoma.

Se puede utilizar cualquier combinación de promotor/potenciador (según la Base de Datos de Promotores Eucariotas EPDB) para impulsar la expresión del gen, aunque muchos restringirán la expresión a un tipo de tejido particular o subconjunto de tejidos. (Revisado en, por ejemplo, Kutzler, M.A., and Weiner, D.B., 2008. *Nature Reviews Genetics* 9:776-88). Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, potenciadores de actina humana, miosina, hemoglobina, creatina quinasa muscular, secuencias y de virus CMV, RSV y EBV. Se pueden seleccionar potenciadores apropiados para aplicaciones particulares. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de suministro o como una construcción de expresión genética adicional.

3. Señales de poliadenilación

Cuando se emplea un inserto de ADNc, normalmente se deseará incluir una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada del transcrito del gen. No se considera que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica satisfactoria de los presentes métodos, y se emplea cualquiera de dichas secuencias, como la hormona del crecimiento humana o bovina y las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR. Un ejemplo no limitante es la señal de poliadenilación de SV40 presente en el plásmido pCEP3 (Invitrogen, Carlsbad, California). También se contempla como un elemento del casete de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles de los mensajes y minimizar la lectura del casete a otras secuencias. Las secuencias señal de terminación o poli(A) se pueden colocar, por ejemplo, aproximadamente 11-30 nucleótidos en dirección descendente de una secuencia conservada (AAUAAA) en el extremo 3' del ARNm. (Montgomery, D.L., et al., 1993. *DNA Cell Biol.* 12:777-83; Kutzler, M.A., and Weiner, D.B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88).

4. Señales de iniciación y sitios de unión de ribosomas internos

También se puede requerir una señal de iniciación específica para la traducción eficiente de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Es posible que sea necesario proporcionar señales de control de traducción exógenas, que incluyen el codón de iniciación ATG. El codón de iniciación se coloca en marco con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Las señales de control de traducción exógenas y los codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

En ciertas realizaciones, el uso de elementos de sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) se utiliza para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES pueden pasar por alto el modelo de escaneo de ribosomas de la traducción dependiente del extremo metilado en 5' y comenzar la traducción en los sitios internos (Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988). Se han discutido elementos IRES de dos miembros de la familia de los picornavirus (poliomielitis y encefalomiocarditis) (Pelletier and Sonenberg, 1988), así como un mensaje IRES de un mamífero (Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991). Los elementos IRES se pueden ligar a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficiente. Múltiples genes se pueden expresar eficientemente utilizando un solo promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje (véase Patentes de EE.UU. No. 5,925,565 y 5,935,819).

Optimización de Secuencia

La producción de proteínas también se puede incrementar al optimizar los codones en el transgén. Se pueden utilizar cambios de codones específicos de especies para aumentar la producción de proteínas. También, los codones se pueden optimizar para producir un ARN optimizado, lo que puede dar como resultado una traducción más eficiente. Al optimizar los codones que se incorporarán en el ARN, se pueden eliminar elementos tales como aquellos que dan como resultado una estructura secundaria que provoca inestabilidad, estructuras de ARNm secundarias que pueden, por ejemplo, inhibir la unión ribosómica o secuencias crípticas que pueden inhibir la exportación nuclear de ARNm. (Kutzler, M.A., and Weiner, D.B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Yan, J. et al., 2007. *Mol. Ther.* 15:411-21; Cheung, Y.K., et al., 2004. *Vaccine* 23:629-38; Narum, D.L., et al., 2001. 69:7250-55; Yadava, A., and Ockenhouse, C.F., 2003. *Infect. Immun.* 71:4962-69; Smith, J.M., et al., 2004. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20:1335-47; Zhou, W., et al., 2002. *Vet. Microbiol.* 88:127-51; Wu,

X., et al., 2004. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:89-96; Zhang, W., et al., 2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349:69-78; Deml, L.A., et al., 2001. *J. Virol.* 75:1099-11001; Schneider, R. M., et al., 1997. *J. Virol.* 71:4892-4903; Wang, S.D., et al., 2006. *Vaccine* 24:4531-40; zur Megede, J., et al., 2000. *J. Virol.* 74:2628-2635). Por ejemplo, el FKBP12 u otro polipéptido de la región multimerizante, el polipéptido de Caspasa-9 y las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido TCR se pueden optimizar mediante cambios en los codones.

Secuencias de líder

Se pueden agregar secuencias líder para potenciar la estabilidad del ARNm y dar como resultado una traducción más eficiente. La secuencia líder usualmente está involucrada en la dirección del ARNm al retículo endoplásmico. Los ejemplos incluyen la secuencia señal para la glicoproteína de envoltura del VIH-1 (Env), que retrasa su propia escisión, y la secuencia líder del gen IgE (Kutzler, M.A., and Weiner, D.B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Li, V., et al., 2000. *Virology* 272:417-28; Xu, Z.L., et al. 2001. *Gene* 272:149-56; Malin, A.S., et al., 2000. *Microbes Infect.* 2:1677-85; Kutzler, M.A., et al., 2005. *J. Immunol.* 175:112-125; Yang, J.S., et al., 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1379-84; Kumar, S., et al., 2006. *DNA Cell Biol.* 25:383-92; Wang, S., et al., 2006. *Vaccine* 24:4531-40). El líder de IgE se puede utilizar para potenciar la inserción en el retículo endoplásmico (Tepler, I, et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5912).

La expresión de los transgenes se puede optimizar y/o controlar mediante la selección de métodos apropiados para optimizar la expresión. Estos métodos incluyen, por ejemplo, la optimización de promotores, métodos de suministro y secuencias de genes (por ejemplo, como se presenta en Laddy, D.J., et al., 2008. *PLoS. ONE* 3 e2517; Kutzler, M.A., and Weiner, D.B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88).

Ácidos nucleicos

Un "ácido nucleico", tal como se utiliza en el presente documento, generalmente se refiere a una molécula (una, dos o más hebras) de ADN, ARN o un derivado o análogo del mismo, que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina de origen natural que se encuentra en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o ARN (por ejemplo, una A, una G, una "U" de uracilo o una C). El término "ácido nucleico" abarca los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero del término "ácido nucleico". Los ácidos nucleicos pueden tener, al menos tener, como máximo tener o aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos, o cualquier rango derivado de ellos, en longitud.

Los ácidos nucleicos en el presente documento proporcionados pueden tener regiones de identidad o complementariedad con otro ácido nucleico. Se contempla que la región de complementariedad o identidad puede tener al menos 5 residuos contiguos, aunque específicamente se contempla que la región tiene, al menos tiene, como máximo tiene, o aproximadamente tiene 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos contiguos.

Como se utiliza en el presente documento, "hibridación", "hibrida" o "capaz de hibridar" se entiende que significa formar una molécula de doble o triple hebra o una molécula con naturaleza parcial de doble o triple hebra. El término "recocer" como se utiliza en el presente documento es sinónimo de "hibridar". El término "hibridación", "hibrida(n)" o "capaz de hibridar" abarca los términos "condiciones rigurosas" o "alta rigurosidad" y los términos "baja rigurosidad" o "condiciones de baja rigurosidad".

Como se utiliza en el presente documento, "condición(es) rigurosa(s)" o "alta rigurosidad" son aquellas condiciones que permiten la hibridación entre o dentro de una o más hebra(s) de ácido nucleico que contienen secuencias complementarias, pero excluyen la hibridación de secuencias aleatorias. Las condiciones rigurosas toleran poco o ningún emparejamiento erróneo entre un ácido nucleico y una hebra diana. Dichas condiciones son conocidas y se utilizan a menudo para aplicaciones que requieren una alta selectividad. Las aplicaciones no limitantes incluyen el aislamiento de un ácido nucleico, tales como un gen o un segmento de ácido nucleico del mismo, o la detección de al menos un transcrito de ARNm específico o un segmento de ácido nucleico del mismo, y similares.

Las condiciones rigurosas pueden comprender condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0.02 M a aproximadamente 0.5 M a temperaturas de aproximadamente 42 grados C a aproximadamente 70 grados C. Se entiende que la temperatura y la fuerza iónica de una rigurosidad está determinada en parte por la longitud de los ácido(s) nucleico(s) particulares, la longitud y el contenido de nucleobases de las secuencia(s) diana, la composición de carga de los ácidos nucleicos y la presencia o concentración de formamida, cloruro de tetrametilamonio u otro(s) solvente(s) en una mezcla de hibridación.

Se entiende que estos rangos, composiciones y condiciones para la hibridación se mencionan únicamente a modo de ejemplos no limitantes, y que la rigurosidad deseada para una reacción de hibridación particular a menudo se determina empíricamente en comparación con uno o más controles positivos o negativos. Dependiendo de la aplicación prevista, se pueden emplear diversas condiciones de hibridación para lograr diversos grados de selectividad de un ácido nucleico hacia una secuencia diana. En un ejemplo no limitante, la identificación o el aislamiento de un ácido nucleico diana relacionado que no se hibrida con un ácido nucleico en condiciones rigurosas se puede lograr mediante hibridación a baja temperatura y/o alta fuerza iónica. Dichas condiciones se denominan "baja rigurosidad" o "condiciones de baja rigurosidad", y los ejemplos no limitantes de baja rigurosidad incluyen la hibridación realizada con NaCl de aproximadamente 0.15 M a aproximadamente 0.9 M en un rango de temperatura de aproximadamente 20 grados C a aproximadamente 50 grados C. Las condiciones de rigurosidad baja o alta se pueden modificar aún más para adaptarse a una aplicación particular.

Las "variantes conservadoras de la función" son proteínas o enzimas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado sin alterar la conformación general y la función de la proteína o enzima, que incluye, pero no se limita a, el reemplazo de un aminoácido por otro que tiene propiedades similares, que incluyen carácter polar o no polar, tamaño, forma y carga. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos para muchos de los aminoácidos comúnmente conocidos no codificados genéticamente son bien conocidas en la técnica. Las sustituciones conservadoras de otros aminoácidos no codificados se pueden determinar en base a sus propiedades físicas en comparación con las propiedades de los aminoácidos codificados genéticamente.

Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima, de tal manera que el porcentaje de similitud de la secuencia de proteínas o aminoácidos entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos el 90 % y, por ejemplo, al menos el 95 %, determinado según un esquema de alineación. Como se menciona en el presente documento, "similitud de secuencia" significa el grado en que se relacionan las secuencias de nucleótidos o proteínas. El grado de similitud entre dos secuencias puede basarse en el porcentaje de identidad y/o conservación de la secuencia. "Identidad de secuencia" en el presente documento significa el grado en que dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos son invariantes. "Alineación de secuencias" significa el proceso de alinear dos o más secuencias para lograr niveles máximos de identidad (y, en el caso de secuencias de aminoácidos, conservación) con el fin de valorar el grado de similitud. Se conocen en la técnica numerosos métodos para alinear secuencias y valorar la similitud/identidad tales como, por ejemplo, el Método de Agrupación, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN, así como en BLASTN, BLASTP y FASTA. Al utilizar cualquiera de estos programas, los ajustes utilizados son los que dan como resultado la mayor similitud de secuencia.

Modificación de ácido nucleico

Cualquiera de las modificaciones discutidas a continuación se puede aplicar a un ácido nucleico. Los ejemplos de modificaciones incluyen alteraciones en la estructura principal de ARN o ADN, azúcar o base, y varias combinaciones de los mismos. Se puede modificar cualquier número adecuado de enlaces de la estructura principal, azúcares y/o bases en un ácido nucleico (por ejemplo, independientemente aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, hasta 100 %). Un nucleósido no modificado es cualquiera de las bases adenina, citosina, guanina, timina o uracilo unidas al carbono 1' de la β-D-ribo-furanosa.

Una base modificada es una base de nucleótido distinta de adenina, guanina, citosina y uracilo en una posición 1'. Los ejemplos no limitantes de bases modificadas incluyen inosina, purina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2, 4, 6-trimetoxibenceno, 3-metiluracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5- alquilcitidinas (por ejemplo, 5-metilcitidina), 5- alquiluridinas (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6- alquilpirimidinas (por ejemplo, 6-metiluridina), propino y similares. Otros ejemplos no limitantes de bases modificadas incluyen nitropirrolilo (por ejemplo, 3-nitropirrolilo), nitroindolilo (por ejemplo, 4-, 5-, 6-nitroindolilo), hipoxantinilo, isoinosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-desaza-inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo, difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol, 3-metilisocarboestirilo, 5-metilisocarboestirilo, 3-metil-7-propinilisocarboestirilo, 7-azaindolilo, 6- metil-7-azaindolilo, imidizopiridinilo, 9-metilimidizopiridinilo, pirrolopiridinilo, isocarboestirilo, 7-propinil isocarboestirilo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antracenilo, fenantracenilo, pirenilo, estilbenilo, tetracenilo, pentacenilo y similares.

En algunas realizaciones, por ejemplo, un ácido nucleico puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas, con modificaciones de la estructura principal de fosfato. Los ejemplos no limitantes de modificaciones de la estructura principal incluyen modificaciones de fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal y/o

alquilisililo. En ciertos casos, una fracción de azúcar de ribosa que se produce naturalmente en un nucleósido se reemplaza con un azúcar de hexosa, un anillo heteroalquilo policíclico o un grupo ciclohexenilo. En ciertos casos, el azúcar de hexosa es una alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa o un derivado de las mismas. La hexosa puede ser una D-hexosa, glucosa o manosa. En ciertos casos, el grupo heteroalquilo policíclico puede ser un anillo bicíclico que contiene un átomo de oxígeno en el anillo. En ciertos casos, el grupo heteroalquilo policíclico es un biciclo[2.2.1]heptano, un biciclo[3.2.1]octano o un biciclo[3.3.1]nonano.

Las nucleobases de nitropirrolilo y nitroindolilo son miembros de una clase de compuestos conocidos como bases universales. Las bases universales son aquellos compuestos que pueden reemplazar cualquiera de las cuatro bases de origen natural sin afectar sustancialmente el comportamiento de fusión o la actividad del dúplex de oligonucleótidos. A diferencia de las interacciones estabilizadoras de enlaces de hidrógeno asociadas con las bases nitrogenadas de origen natural, los dúplex de oligonucleótidos que contienen bases nitrogenadas de 3-nitropirrolilo se pueden estabilizar únicamente mediante interacciones de apilamiento. La ausencia de interacciones de enlaces de hidrógeno significativas con bases nitrogenadas de nitropirrolilo obvia la especificidad por una base complementaria específica. Además, 4-, 5- y 6-nitroindolilo muestran muy poca especificidad para las cuatro bases naturales. Los procedimientos para la preparación de 1-(2'-O-metil- β -D-ribofuranosil)-5-nitroindol se discuten en Gaubert, G.; Wengel, J. *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 5629. Otras bases universales incluyen hipoxantinilo, isoinosinilo, 2-aza-inosinilo, 7-desaza-inosinilo, nitroimidazolilo, nitropirazolilo, nitrobencimidazolilo, nitroindazolilo, aminoindolilo, pirrolopirimidinilo y derivados estructurales de los mismos.

El difluorotolilo es una nucleobase no natural que funciona como una base universal. El difluorotolilo es un isómero de la nucleobase natural timina. Pero a diferencia de la timina, el difluorotolilo no muestra una selectividad apreciable por ninguna de las bases naturales. Otros compuestos aromáticos que funcionan como bases universales son el 4-fluoro-6-metilbencimidazol y el 4-metilbencimidazol. Además, los derivados de isocarboestirilo relativamente hidrófobos 3-metil isocarboestirilo, 5-metil isocarboestirilo y 3-metil-7-propinil isocarboestirilo son bases universales que provocan solo una ligera desestabilización de los dúplex de oligonucleótidos en comparación con la secuencia de oligonucleótidos que contiene solo bases naturales. Otras bases nitrogenadas no naturales incluyen 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidizopiridinilo, 9-metil-imidizopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarboestirilo, 7-propinil isocarboestirilo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antracenilo, fenantrenilo, pirenilo, estilbenilo, tetracenilo, pentacenilo y derivados estructurales de los mismos. Para una discusión más detallada, que incluyen los procedimientos sintéticos, de difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol y otras bases no naturales mencionadas anteriormente, consulte: Schweitzer et al., *J. Org. Chem.*, 59:7238-7242 (1994);

Además, se pueden utilizar sustituyentes químicos, por ejemplo, agentes de entrecruzamiento, para agregar más estabilidad o irreversibilidad a la reacción. Los ejemplos no limitantes de agentes de entrecruzamiento incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen los ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Un análogo de nucleótido también puede incluir un ácido nucleico "bloqueado". Ciertas composiciones se pueden utilizar para "anclar" o "bloquear" esencialmente un ácido nucleico endógeno en una estructura particular. Las secuencias de anclaje sirven para evitar la disociación de un complejo de ácido nucleico y, por lo tanto, no solo pueden evitar la copia, sino que también pueden permitir el marcado, la modificación y/o la clonación de la secuencia endógena. La estructura bloqueada puede regular la expresión génica (es decir, inhibir o mejorar la transcripción o la replicación), o se puede utilizar como una estructura estable que se puede utilizar para marcar o modificar de otro modo la secuencia de ácidos nucleicos endógeno, o se puede utilizar para aislar la secuencia endógena, es decir, para clonación.

Las moléculas de ácido nucleico no necesitan limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN o ADN, sino que además abarcan nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente. El porcentaje de no nucleótidos o nucleótidos modificados puede ser del 1 % al 100 % (por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %)

Preparación de ácido nucleico

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico para uso como control o estándar en un ensayo, o terapéutico, por ejemplo. Un ácido nucleico se puede fabricar mediante cualquier técnica conocida en la materia, tal como por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Los ácidos nucleicos se pueden recuperar o aislar de una muestra biológica. El ácido nucleico puede ser recombinante o puede ser natural o endógeno a la célula (producido a partir del genoma de la célula). Se contempla que una muestra biológica se pueda tratar de manera que potencie la recuperación de moléculas pequeñas de ácido nucleico. En general, los métodos pueden implicar la lisis de células con una solución que tenga guanidinio y un detergente.

La síntesis de ácidos nucleicos también se puede realizar de acuerdo con métodos estándar. Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético) incluyen un ácido nucleico elaborado mediante síntesis química in vitro utilizando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas en fase sólida o a través de

intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato. En otros lugares se han descrito varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos.

Los ácidos nucleicos pueden aislarse utilizando técnicas conocidas. En realizaciones particulares, se pueden emplear métodos para aislar moléculas pequeñas de ácido nucleico y/o moléculas de ARN. La cromatografía es un proceso utilizado para separar o aislar ácidos nucleicos de proteínas o de otros ácidos nucleicos. Dichos métodos pueden implicar electroforesis con una matriz de gel, columnas de filtro, precipitación con alcohol y/u otra cromatografía. Si se va a utilizar o evaluar un ácido nucleico de las células, los métodos generalmente implican lisar las células con un caotrópico (por ejemplo, isotiocianato de guanidinio) y/o detergente (por ejemplo, N-lauroil sarcosina) antes de implementar procesos para aislar poblaciones particulares de ARN.

Los métodos pueden implicar el uso de solventes orgánicos y/o alcohol para aislar ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la cantidad de alcohol agregada a un lisado celular alcanza una concentración de alcohol de aproximadamente 55 % a 60 %. Si bien se pueden emplear diferentes alcoholes, el etanol funciona bien. Un soporte sólido puede ser cualquier estructura e incluye perlas, filtros y columnas, que pueden incluir un soporte mineral o polimérico con grupos electronegativos. Un filtro o columna de fibra de vidrio es efectivo para tales procedimientos de aislamiento.

Un proceso de aislamiento de ácidos nucleicos a veces puede incluir: a) lisar células en la muestra con una solución de lisis que comprende guanidinio, donde se produce un lisado con una concentración de al menos aproximadamente guanidinio 1 M; b) extraer moléculas de ácido nucleico del lisado con una solución de extracción que comprende fenol; c) agregar al lisado una solución de alcohol para formar una mezcla de lisado/alcohol, en la que la concentración de alcohol en la mezcla está entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 70 %; d) aplicar la mezcla de lisado/alcohol a un soporte sólido; e) eluir las moléculas de ácido nucleico del soporte sólido con una solución iónica; y f) capturar las moléculas de ácido nucleico. La muestra se puede secar y resuspender en un líquido y volumen apropiado para la manipulación posterior.

Métodos de transferencia de genes

Para mediar en el efecto de la expresión del transgén en una célula, será necesario transferir las construcciones de expresión a una célula. Dicha transferencia puede emplear métodos virales o no virales de transferencia de genes. Esta sección proporciona una discusión de métodos y composiciones de transferencia de genes.

Se genera una célula transformada que comprende un vector de expresión al introducir el vector de expresión en la célula. Los métodos adecuados para el suministro de polinucleótidos para la transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para uso con los métodos actuales incluyen prácticamente cualquier método mediante el cual un polinucleótido (por ejemplo, ADN) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo.

Una célula huésped se puede utilizar, y se ha utilizado, como receptora de vectores. Las células huésped pueden derivar de procariotas o eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de parte o la totalidad de las secuencias de polinucleótidos codificadas por el vector. Numerosas estirpes celulares y cultivos están disponibles para uso como célula huésped, y se pueden obtener a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo de cultivos vivos y materiales genéticos. En realizaciones específicas, la célula huésped es una célula T, un linfocito que se infiltra en el tumor, una célula destructora natural o una célula T destructora natural.

Se puede determinar un huésped apropiado. Generalmente esto se basa en la estructura principal del vector y el resultado deseado. Un plásmido o cósmido, por ejemplo, se puede introducir en una célula huésped procariota para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas utilizadas como células huésped para la replicación y/o expresión del vector incluyen DH5α, JM109 y KC8, así como una serie de huéspedes bacterianos disponibles comercialmente tal como células competentes SURE® y células SOLOPACK Gold (STRATAGENE®, La Jolla, CA). Alternativamente, se podrían utilizar células bacterianas tales como E. coli LE392 como células huéspedes para virus fagos. Las células eucariotas que se pueden utilizar como células huésped incluyen, pero no se limitan a levaduras, insectos y mamíferos. Los ejemplos de células huésped eucarióticas de mamíferos para la replicación y/o expresión de un vector incluyen, pero no se limitan a, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, CHO, Saos y PC12. Los ejemplos de cepas de levadura incluyen, pero no se limitan a, YPH499, YPH500 e YPH501.

Las vacunas de ácido nucleico pueden incluir, por ejemplo, vectores de ADN no viral, ADN y ARN "desnudos" y vectores virales. Los métodos para transformar células con estas vacunas y para optimizar la expresión de genes incluidos en estas vacunas son conocidos y también se discuten en el presente documento.

Ejemplos de métodos de transferencia de ácido nucleico o vector viral

Se puede utilizar cualquier método apropiado para transfectar o transformar las células, por ejemplo, las células T, o para administrar las secuencias de nucleótidos o las composiciones de los presentes métodos. Ciertos ejemplos se presentan en el presente documento, y además incluyen métodos tales como el suministro utilizando polímeros catiónicos, moléculas similares a lípidos y ciertos productos comerciales tales como, por ejemplo, IN-VIVO-JET PEI.

1. Transformación ex vivo

Hay varios métodos disponibles para transfectar células y tejidos vasculares extraídos de un organismo en un entorno ex vivo. Por ejemplo, las células endoteliales caninas se han alterado genéticamente mediante la transferencia de genes retrovirales in vitro y se han trasplantado a un canino (Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989). En otro ejemplo, se transfectaron células endoteliales de minipig de Yucatán in vitro con retrovirus y se trasplantaron a una arteria utilizando un catéter de doble globo (Nabel et al., Science, 244(4910):1342-1344, 1989). Por lo tanto, se contempla que las células o los tejidos se puedan eliminar y transfectar ex vivo utilizando los polinucleótidos presentados en el presente documento. En aspectos particulares, las células o tejidos trasplantados se pueden colocar en un organismo. Por ejemplo, las células T se pueden obtener de un animal, las células se pueden transfectar o transformar con el vector de expresión y luego volver a administrarse al animal.

2. Inyección

En ciertas realizaciones, una célula, un ácido nucleico o un vector viral se puede administrar a un órgano, una célula, un tejido o un organismo a través de una o más inyecciones (es decir, una inyección con aguja), tal como, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraprotática, intratumoral, intraperitoneal, etc. Los métodos de inyección incluyen, por ejemplo, la inyección de una composición que comprende una solución salina. Otras realizaciones incluyen la introducción de un polinucleótido mediante microinyección directa. La cantidad del vector de expresión utilizado puede variar según la naturaleza del antígeno así como del órgano, célula, tejido u organismo utilizado.

Las inyecciones intradérmicas, intraganglionares o intralinfáticas son algunos de los métodos de administración de CD más utilizados. La inyección intradérmica se caracteriza por una baja tasa de absorción en el torrente sanguíneo pero una rápida captación en el sistema linfático. La presencia de un gran número de células dendríticas de Langerhans en la dermis transportará el antígeno intacto y procesado a los ganglios linfáticos de drenaje. Es necesaria una preparación adecuada del sitio para realizar esto correctamente (es decir, se corta el cabello para observar la colocación correcta de la aguja). La inyección intraganglionar permite el suministro directo del antígeno a los tejidos linfoides. La inyección intralinfática permite la administración directa de CD.

3. Electroporación

En ciertas realizaciones, se introduce un polinucleótido en un órgano, una célula, un tejido o un organismo mediante electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alto voltaje. En algunas variantes de este método, ciertas enzimas que degradan la pared celular, tal como las enzimas que degradan la pectina, se emplean para hacer que las células receptoras diana sean más susceptibles a la transformación por electroporación que las células no tratadas (Patente de EE.UU. No. 5,384,253).

La transfección de células eucariotas utilizando electroporación ha tenido bastante éxito. Se han transfectado linfocitos pre-B de ratón con genes de inmunoglobulina κ humana ((Potter et al., (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81, 7161-7165), y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa et al., (1986) Mol. Cell Biol., 6,716-718) de esta forma.

La electroporación in vivo para vacunas, o eVac, se implementa clínicamente a través de una técnica de inyección simple. Un vector de ADN que codifica un antígeno tumoral se inyecta por vía intradérmica en un paciente. Luego, los electrodos aplican pulsos eléctricos al espacio intradérmico haciendo que las células localizadas allí, especialmente las células dendríticas dérmicas residentes, tomen el vector de ADN y expresen el antígeno tumoral codificado. Estas células dendríticas que expresan antígenos tumorales activadas por la inflamación local pueden luego migrar a los ganglios linfáticos, presentando antígenos tumorales y estimulando las células T específicas del antígeno tumoral. Un ácido nucleico se administra electroporéticamente cuando se administra mediante electroporación, después de, por ejemplo, pero sin limitarse a, la inyección del ácido nucleico o cualquier otro medio de administración en el que el ácido nucleico se pueda suministrar a las células mediante electroporación.

Los métodos de electroporación se discuten, por ejemplo, en Sardesai, N.Y., and Weiner, D.B., Current Opinión in Immunotherapy 23:421-9 (2011) and Ferraro, B. et al., Human Vaccines 7:120-127 (2011).

4. Fosfato de calcio

En otras realizaciones, se introduce un polinucleótido en las células utilizando precipitación con fosfato de calcio. Se han transfectado células KB humanas con ADN de adenovirus 5 (Graham and van der Eb, (1973) Virology, 52,456-467) utilizando esta técnica. También de esta manera, se transfectaron células L de ratón (A9) C127 de ratón, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de neomicina (Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987), y se transfectaron hepatocitos de rata con una variedad de genes marcadores (Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990).

5. DEAE-Dextrano

En otra realización, se suministra un polinucleótido en una célula utilizando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos informadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, T.V., Mol Cell Biol. 1985 May;5(5):1188-90).

6. Carga de sonicación

Realizaciones adicionales incluyen la introducción de un polinucleótido mediante carga sónica directa. Se han transfectado fibroblastos LTK con el gen de la timidina quinasa mediante carga con ultrasonidos (Fechheimer et al., (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84, 8463-8467).

7. Transfección mediada por liposomas

En una realización adicional, un polinucleótido puede quedar atrapado en un complejo lipídico tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan autodisposición antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh and Bachhawat, (1991) In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands. pp. 87-104). También se contempla un polinucleótido complejoado con Lipofectamine (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

8. Transfección mediada por receptor

Aún más, un polinucleótido se puede suministrar a una célula diana a través de vehículos de suministro mediados por receptores. Éstos aprovechan la captación selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por receptor que se producirá en una célula diana. En vista de la distribución específica del tipo de célula de varios receptores, este método de suministro agrega otro grado de especificidad. Ciertos vehículos dirigidos a genes mediados por receptores comprenden un ligando específico del receptor celular y un agente de unión a polinucleótidos. Otros comprenden un ligando específico del receptor celular al que se ha ligado operativamente el polinucleótido a suministrar. Se han utilizado varios ligandos para la transferencia de genes mediada por receptores (Wu and Wu, (1987) J. Biol. Chem., 262, 4429-4432; Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(9):3410-3414, 1990; Perales et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4086-4090, 1994; Myers, EPO 0273085), que establece la operatividad de la técnica. Se ha discutido la entrega específica en el contexto de otro tipo de células de mamíferos (Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993).

En ciertos aspectos, se elige un ligando para que corresponda a un receptor expresado específicamente en la población de células diana.

En otras realizaciones, un componente de vehículo de suministro de polinucleótidos de un vehículo dirigido a polinucleótidos específico de células puede comprender un ligando de unión específico en combinación con un liposoma. El(los) polinucleótido(s) a suministrar se aloja(n) dentro del liposoma y el ligando de unión específica se incorpora funcionalmente a la membrana del liposoma. El liposoma se unirá así específicamente a el(los) receptor(es) de una célula diana y suministrará el contenido a una célula. Se ha mostrado que dichos sistemas son funcionales utilizando sistemas en los que, por ejemplo, se utiliza el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el suministro mediado por receptor de un polinucleótido a células que exhiben una regulación al alza del receptor de EGF.

En aún otras realizaciones, el componente del vehículo de suministro de polinucleótidos de un vehículo de suministro dirigido puede ser un liposoma en sí mismo, que puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica de células. Por ejemplo, la lactosil-ceramida, un asialogangliósido galactoseterminal, se ha incorporado a los liposomas y se ha observado un aumento en la captación del gen de la insulina por parte de los hepatocitos (Nicolau et al., (1987) Methods Enzymol., 149, 157-176). Se contempla que las construcciones transformadoras específicas de tejido se puedan suministrar específicamente en una célula diana de manera similar.

9. Bombardeo de microproyectiles

Las técnicas de bombardeo con microproyectiles se pueden utilizar para introducir un polinucleótido en al menos un orgánulo, célula, tejido u organismo (Patente de EE.UU. No. 5,550,318; Patente de EE.UU. No. 5,538,880; Patente de EE.UU. No. 5,610,042; y Solicitud PCT WO 94/09699).

Este método depende de la capacidad de acelerar los microproyectiles recubiertos de ADN a una alta velocidad, lo que les permite perforar las membranas celulares y entrar en las células sin destruirlas (Klein et al., (1987) Nature, 327, 70-73). Existe una amplia variedad de técnicas de bombardeo con microproyectiles conocidas en la técnica, muchas de las cuales son aplicables a los presentes métodos.

En este bombardeo con microproyectiles, una o más partículas se pueden recubrir con al menos un polinucleótido y administrar en las células mediante una fuerza propulsora. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de dichos dispositivos se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang et al., (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87, 9568-9572). Los microproyectiles utilizados han consistido en sustancias biológicamente inertes tal como partículas o perlas de tungsteno o de oro. Partículas de ejemplo incluyen aquellas compuestas de tungsteno, platino y, en ciertos ejemplos, oro, que incluyen, por ejemplo, nanopartículas. Se contempla que, en algunos casos, la precipitación de ADN sobre partículas metálicas no sería necesaria para el suministro de ADN a una célula receptora utilizando bombardeo con microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas pueden contener ADN en lugar de ser recubiertas con ADN. Las partículas recubiertas de ADN pueden aumentar el nivel de suministro de ADN mediante el bombardeo de partículas, pero no son necesarias.

10 Transferencia mediada por transposones

También se pueden emplear métodos de transferencia mediada por transposones utilizando, por ejemplo, el sistema de transferencia de genes piggy/Bac. Sato, M., et al., Biotechnol J. 2014 Oct 24. doi: 10.1002/biot.201400283. [Epub antes de impresión].

Ejemplos de métodos de transferencia mediada por vectores virales

En los presentes métodos se puede emplear cualquier vector viral adecuado para administrar secuencias de nucleótidos, o composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos, a una célula o a un sujeto, de tal manera que la célula o células del sujeto puedan expresar los genes codificados por las secuencias de nucleótidos. En ciertas realizaciones, se incorpora un transgén en una partícula viral para mediar en la transferencia de genes a una célula. Normalmente, el virus simplemente se expondrá a la célula huésped adecuada bajo condiciones fisiológicas, lo que permitirá la captación del virus. Los presentes métodos se emplean ventajosamente utilizando una variedad de vectores virales, como se discuten a continuación.

1. adenovirus

El adenovirus es particularmente adecuado para uso como vector de transferencia de genes debido a su genoma de ADN de tamaño mediano, facilidad de manipulación, alto título, amplio rango de células diana y alta infectividad. El genoma viral de aproximadamente 36 kb está delimitado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100-200 pares de bases (pb), en las que están contenidos elementos que actúan en cis necesarios para la replicación y el empaque del ADN viral. Las regiones temprana (E) y tardía (L) del genoma que contienen diferentes unidades de transcripción se dividen por el inicio de la replicación del ADN viral.

La región E1 (E1A y E1B) codifica proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral y algunos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las proteínas para la replicación del ADN viral. Estas proteínas están involucradas en la replicación del ADN, la expresión génica tardía y el apagado de la célula huésped (Renan, M. J. (1990) Radiother Oncol., 19, 197-218). Los productos de los genes tardíos (L1, L2, L3, L4 y L5), incluida la mayoría de las proteínas de la cápside viral, se expresan solo después de un procesamiento significativo de una sola transcripción primaria emitida por el principal promotor tardío (MLP). El MLP (ubicado en 16.8 unidades de mapa) es particularmente eficiente durante la fase tardía de la infección, y todos los ARNm emitidos por este promotor poseen una secuencia líder tripartita (TL) en 5', lo que los hace útiles para la traducción.

Para que el adenovirus se optimice para la terapia génica, es necesario maximizar la capacidad de carga para que se puedan incluir grandes segmentos de ADN. También es muy deseable reducir la toxicidad y la reacción inmunológica asociada con ciertos productos adenovirales. Los dos objetivos son, hasta cierto punto, colindantes en que la eliminación de los genes adenovirales sirve para ambos fines. Mediante la práctica de los presentes métodos, es posible lograr ambos objetivos mientras que conserva la capacidad de manipular las construcciones terapéuticas con relativa facilidad.

El gran desplazamiento del ADN es posible porque los elementos cis necesarios para la replicación del ADN viral están todos localizados en las repeticiones terminales invertidas (ITR) (100-200 pb) en cualquier extremo del genoma viral lineal. Los plásmidos que contienen ITR se pueden replicar en presencia de un adenovirus no defectuoso (Hay, R.T., et al., J Mol Biol. 1984 Jun 5;175(4):493-510). Por lo tanto, la inclusión de estos elementos en un vector adenoviral puede permitir la replicación.

Además, la señal de empaque para la encapsulación viral se localiza entre 194-385 pb (0.5-1.1 unidades de mapa) en el extremo izquierdo del genoma viral (Hearing et al., J. (1987) Virol., 67, 2555-2558). Esta señal imita el sitio de reconocimiento de proteínas en el ADN del bacteriófago lambda donde una secuencia específica cerca del extremo izquierdo, pero fuera de la secuencia del extremo cohesivo, media la unión a las proteínas que se requieren para la inserción del ADN en la estructura de la cabeza. Los vectores de sustitución E1 de Ad han demostrado que un fragmento de 450 pb (0-1.25 unidades de mapa) en el extremo izquierdo del genoma viral podría dirigir el empaque en 293 células (Levrero et al., Gene, 101:195-202, 1991).

Previamente, se ha mostrado que ciertas regiones del genoma adenoviral se pueden incorporar al genoma de células de mamíferos y los genes codificados así expresados. Estas estirpes celulares son capaces de soportar la replicación de un vector adenoviral que es deficiente en la función adenoviral codificada por la estirpe celular. También ha habido informes de complementación de vectores adenovirales de replicación deficiente por vectores “ayudantes”, por ejemplo, virus de

Los vectores adenovirales de replicación deficiente se pueden complementar, en trans, con virus auxiliares. Sin embargo, esta observación por sí sola no permite el aislamiento de los vectores de replicación deficiente, dado que la presencia del virus auxiliar, necesario para proporcionar funciones replicativas, contaminaría cualquier preparación. Por lo tanto, se necesitaba un elemento adicional que agregaría especificidad a la replicación y/o empaque del vector deficiente de replicación. Ese elemento deriva de la función de empaque del adenovirus.

Se ha mostrado que existe una señal de empaque para adenovirus en el extremo izquierdo del mapa de adenovirus convencional (Tibbetts et. al. (1977) Cell, 12,243-249). Estudios posteriores mostraron que un mutante con una supresión en la región E1A (194-358 pb) del genoma creció pobremente incluso en una estirpe celular que complementó la función temprana (E1A) (Hearing and Shenk, (1983) J. Mol. Biol. 167,809-822). Cuando se recombinó un ADN adenoviral compensador (0-353 pb) en el extremo derecho del mutante, el virus se empacó normalmente. Un análisis mutacional adicional identificó un elemento corto, repetido y dependiente de la posición en el extremo izquierdo del genoma de Ad5. Se encontró que una copia de la repetición era suficiente para un empaque eficiente si estaba presente en cualquiera de los extremos del genoma, pero no cuando se movía hacia el interior de la molécula de ADN Ad5 (Hearing et al., J. (1987) Virol., 67, 2555-2558).

Al utilizar versiones mutadas de la señal de empaquetado, es posible crear virus auxiliares empaquetados con distintas eficiencias. Normalmente, las mutaciones son mutaciones puntuales o supresiones. Cuando se cultivan virus auxiliares con empaque de baja eficiencia en células auxiliares, el virus se empaqueta, aunque a tasas reducidas en comparación con el virus de tipo silvestre, lo que permite la propagación del auxiliar. Sin embargo, cuando estos virus auxiliares se cultivan en células junto con virus que contienen señales de empaque de tipo silvestre, las señales de empaque de tipo silvestre se reconocen preferencialmente sobre las versiones mutadas. Dada una cantidad limitante de factor de empaque, el virus que contiene las señales de tipo silvestre se empaqueta de forma selectiva en comparación con los auxiliares. Si la preferencia es lo suficientemente grande, se pueden lograr poblaciones que se acerquen a la homogeneidad.

Para mejorar el tropismo de las construcciones de ADV para tejidos o especies particulares, las secuencias de fibra de unión al receptor a menudo se pueden sustituir entre aislados adenovirales. Por ejemplo, el ligando del receptor de adenovirus Coxsackie (CAR) que se encuentra en el adenovirus 5 se puede sustituir por la secuencia de fibra de unión a CD46 del adenovirus 35, lo que produce un virus con una afinidad de unión muy mejorada por las células hematopoyéticas humanas. El virus “pseudotipado” resultante, Ad5f35, ha sido la base para varios aislados virales desarrollados clínicamente. Más aún, existen varios métodos bioquímicos para modificar la fibra para permitir la reorientación del virus a las células diana, tal como, por ejemplo, las células T. Los métodos incluyen el uso de anticuerpos bifuncionales (con un extremo que se une al ligando CAR y un extremo que se une a la secuencia diana) y la biotinylation metabólica de la fibra para permitir la asociación con ligandos quiméricos basados en avidina personalizados. Alternativamente, se podrían unir ligandos (por ejemplo, anti-CD205 mediante ligadores heterobifuncionales (por ejemplo, que contienen PEG), a la partícula de adenovirus.

2. Retrovirus

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN de cadena sencilla caracterizados por la capacidad de convertir su ARN en ADN de cadena doble en células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, (1990) In: Virology, ed., New York: Raven Press, pp. 1437-1500). El ADN resultante luego se integra de manera estable en los cromosomas celulares como un provirus y dirige la síntesis de proteínas virales. La integración da como resultado la retención de las secuencias de genes virales en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retroviral contiene tres genes, gag, pol y env, que codifican las proteínas de la cápside, la enzima polimerasa y los componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia que se encuentra en dirección ascendente del gen gag, denominada psi, funciona como una señal para el empaque del genoma en viriones. Dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) están presentes en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Estos contienen secuencias promotoras y potenciadoras fuertes y también se requieren para la integración en el genoma de la célula huésped (Coffin, 1990). Por lo tanto, por ejemplo, la presente tecnología incluye, por ejemplo, células en las que el polinucleótido utilizado para transducir la célula se integra en el genoma de la célula.

Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifica un promotor en el genoma viral en lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Para producir viriones, se construye una estirpe celular de empaque que contiene los genes gag, pol y env pero sin los componentes LTR y psi (Mann et al., (1983) Cell, 33,153-159). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc humano, junto con las secuencias retrovirales LTR y psi se introduce en esta estirpe celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia psi permite que la transcripción de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales, que luego se secretan en los medios de cultivo (Nicolas, J.F., and Rubenstein, J.L.R., (1988) In: Vectors: a Survey of Molecular

Cloning Vectors and Their Uses, Rodriguez and Denhardt, Eds.). Nicolas and Rubenstein; Temin et al., (1986) In: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188; Mann et al., 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge, opcionalmente se concentra y se utiliza para la transferencia de genes. Los vectores retrovirales pueden infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable de muchos tipos de retrovirus requieren la división de las células huésped (Paskind et al., (1975) Virology, 67,242-248).

Recientemente se desarrolló un enfoque diseñado para permitir el direccionamiento específico de vectores de retrovirus basado en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de galactosa a la envoltura viral. Esta modificación podría permitir la infección específica de células tales como hepatocitos a través de receptores de asialoglicoproteína, si así se desea.

Se diseñó un enfoque diferente para el direccionamiento de retrovirus recombinantes, que utilizaba anticuerpos biotinilados contra una proteína de la cubierta retroviral y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron a través de los componentes de biotina al utilizar estreptavidina (Roux et al., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 9079-9083). Utilizando anticuerpos contra los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y clase II, se demostró la infección de una variedad de células humanas que portaban esos antígenos de superficie con un virus ecotrópico in vitro (Roux et al., 1989).

3. Lentivirus

Los vectores lentivirales utilizados en los presentes métodos se pueden derivar de cualquier lentivirus apropiado. Los vectores lentivirales son un tipo de vector retroviral, que incluye grupos de primates y no primates. Se discuten ejemplos de vectores lentivirales en, por ejemplo, Coffin et al. (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus pp 758-763). Los ejemplos de lentivirus de primates incluyen, pero no se limitan a: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de autoinmunodeficiencia humana (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). El grupo lentiviral de no primates incluye el prototipo de "virus lento" virus visna/maedi (VMV), el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV). Los lentivirus son capaces de infectar tanto células en división como células que no se dividen (Lewis et al. (1992); Lewis and Emerman (1994)).

Un vector lentiviral, como se utiliza en el presente documento, es un vector que comprende al menos una parte componente, en el que la parte componente está involucrada en los mecanismos biológicos por los cuales el vector infecta células, expresa genes o se replica, derivable de un lentivirus.

La estructura básica de los genomas de retrovirus y lentivirus comparte muchas características comunes, tal como un 5' LTR y un 3' LTR, entre o dentro de los cuales se encuentran una señal de empaque para permitir que el genoma se empaque, un sitio de unión del cebador, sitios de integración para permitir integración en el genoma de una célula huésped y genes gag, pol y env que codifican los componentes de empaque. Los lentivirus también comprenden características adicionales, tales como secuencias rev y RRE en el VIH, que permiten la exportación eficiente de transcritos de ARN del provirus integrado desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula diana infectada.

En el provirus, los genes virales están flanqueados en ambos extremos por regiones denominadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración proviral y la transcripción. Las LTR también sirven como secuencias potenciadoras-promotoras y pueden controlar la expresión de los genes virales.

Las LTR en sí son secuencias idénticas que se pueden dividir en tres elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 se deriva de la secuencia exclusiva del extremo 3' del ARN. R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 se deriva de la secuencia exclusiva del extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes virus.

En ejemplos de los vectores lentivirales discutidos en el presente documento, al menos parte de una o más regiones codificantes de proteínas esenciales para la replicación se pueden eliminar del virus. Esto hace que la replicación del vector viral sea defectuosa. Las partes del genoma viral también se pueden reemplazar por un NOI para generar un vector que comprende un NOI que es capaz de transducir una célula huésped diana que no se divide y/o integrar su genoma en un genoma huésped.

En una realización, los vectores retrovirales son vectores que no se integran, como se discute en los documentos WO 2007/071994, WO 2007/072056, Número de serie de patente de EE.UU. 9,169,491, Número de serie de patente de EE.UU. 8,084,249, o Número de patente de EE.UU. 7,531,648. En algunos ejemplos, el vector lentiviral es un vector retroviral autoinactivante, en el que se han suprimido los potenciadores de la transcripción, o los potenciadores y el promotor en la región U3 de la LTR 3'. (véase, por ejemplo, Yu et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:3194-3198; Dougherty and Temin (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1197-1201; Hawley et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:2406-2410; Yee et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:9564-9568).

El vector de plásmido lentiviral utilizado para producir el genoma viral dentro de una célula huésped/célula de empaque también incluirá secuencias de control reguladoras transcripcionales operativamente ligadas al genoma lentiviral para dirigir la transcripción del genoma en una célula huésped/célula de empaque. Estas secuencias reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas con la secuencia lentiviral transcrita, es decir, la región 5' U3, o pueden ser un promotor heterólogo tal como otro promotor viral, por ejemplo, el promotor CMV.

4. Virus adenoasociado

El AAV utiliza un ADN lineal de cadena sencilla de aproximadamente 4700 pares de bases. Las repeticiones terminales invertidas flanquean el genoma. Dos genes están presentes dentro del genoma, lo que da lugar a una serie de productos génicos distintos. El primero, el gen cap, produce tres proteínas de virión (VP) diferentes, denominadas VP-1, VP-2 y VP-3. El segundo, el gen rep, codifica cuatro proteínas no estructurales (NS). Uno o más de estos productos del gen rep es responsable de transactivar la transcripción de AAV.

Los tres promotores en AAV se designan por su ubicación, en unidades de mapa, en el genoma. Estos son, de izquierda a derecha, p5, p19 y p40. La transcripción da lugar a seis transcritos, dos iniciados en cada uno de los tres promotores, en el que se empalma uno de cada par. El sitio de empalme, derivado de las unidades de mapa 42-46, es el mismo para cada transcrito. Aparentemente, las cuatro proteínas no estructurales se derivan del transcrito más largo, y las tres proteínas del virión surgen todas del transcrito más pequeño.

El AAV no está asociado con ningún estado patológico en humanos. Curiosamente, para una replicación eficiente, el AAV requiere funciones de "ayuda" de virus tales como el virus del herpes simple I y II, el citomegalovirus, el virus de la pseudorrabia y, por supuesto, el adenovirus. El ayudante mejor caracterizado es el adenovirus, y se ha mostrado que muchas funciones "tempranas" de este virus ayudan en la replicación de AAV. Se considera que la expresión de bajo nivel de las proteínas rep de AAV mantiene en verificación la expresión estructural de AAV, y se considera que la infección por el virus auxiliar elimina este bloqueo.

Las repeticiones terminales del vector AAV se pueden obtener por digestión con endonucleasas de restricción de AAV o un plásmido como p201, que contiene un genoma AAV modificado (Samulski et al., J. Virol., 61:3096-3101 (1987)), o por otros métodos, que incluyen, pero no se limitan a, la síntesis química o enzimática de las repeticiones terminales basadas en la secuencia publicada de AAV. Se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de supresión, la secuencia mínima o parte de las ITR de AAV que se requiere para permitir la función, es decir, una integración estable y específica del sitio. También se puede determinar qué modificaciones menores de la secuencia se pueden tolerar mientras se mantiene la capacidad de las repeticiones terminales para dirigir una integración específica del sitio estable.

Los vectores basados en AAV han demostrado ser vehículos seguros y efectivos para el suministro de genes in vitro, y estos vectores se están desarrollando y probando en estadios preclínicos y clínicos para un amplio rango de aplicaciones en terapia génica potencial, tanto ex vivo como in vivo (Carter and Flotte, (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci., 770; 79-90; Chattejee, et al., (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci., 770,79-90; Ferrari et al., (1996) J. Virol., 70,3227-3234; Fisher et al., (1996) J. Virol., 70,520-532; Flotte et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90,10613-10617, (1993); Goodman et al. (1994), Blood, 84,1492-1500; Kaplitt et al., (1994) Nat'l Genet., 8,148-153; Kaplitt, M.G., et al., Ann Thorac Surg. 1996 Dec;62(6):1669-76; Kessler et al., (1996) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93,14082-14087; Koeberl et al., (1997) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 94,1426-1431; Mizukami et al., (1996) Virology, 217,124-130).

La transferencia y expresión génica eficaz mediada por AAV en el pulmón ha dado lugar a ensayos clínicos para el tratamiento de la fibrosis quística (Carter and Flotte, 1995; Flotte et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993)). De manera similar, las perspectivas para el tratamiento de la distrofia muscular mediante el suministro del gen de la distrofina al músculo esquelético mediada por AAV, de la enfermedad de Parkinson mediante el suministro del gen de la tirosina hidroxilasa al cerebro, de la hemofilia B mediante el suministro del gen del Factor IX al hígado y, potencialmente, de infarto de miocardio mediante el gen del factor de crecimiento endotelial vascular al corazón, parecen prometedores ya que recientemente se ha mostrado que la expresión transgénica mediada por AAV en estos órganos es altamente eficiente (Fisher et al., (1996) J. Virol., 70,520-532; Flotte et al., 1993; Kaplitt et al., 1994; 1996; Koeberl et al., 1997; McCown et al., (1996) Brain Res., 713,99-107; Ping et al., (1996) Microcirculation, 3,225-228; Xiao et al., (1996) J. Virol., 70,8098-8108).

5. Otros vectores virales

Se emplean otros vectores virales como construcciones de expresión en los presentes métodos y composiciones. Vectores derivados de virus tales como el virus vaccinia (Ridgeway, (1988) In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, pp. 467-492; Baichwal and Sugden, (1986) In: Gene Transfer, pp. 117-148; Coupar et al., Gene, 68:1-10, 1988) se emplean virus de la viruela del canario y virus del herpes. Estos virus ofrecen varias características para uso en la transferencia de genes a varias células de mamíferos.

Una vez que la construcción se ha administrado en la célula, el ácido nucleico que codifica el transgén se posiciona y expresa en diferentes sitios. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el transgén se integra de forma estable en el genoma de la célula. Esta integración se encuentra en la ubicación y orientación afines a través de la recombinación

homóloga (reemplazo de genes) o se integra en una ubicación aleatoria no específica (aumento de genes). En todavía otras realizaciones, el ácido nucleico se mantiene estable en la célula como un segmento episomal separado de ADN. Dichos segmentos de ácido nucleico o “episomas” codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independientemente o en sincronización con el ciclo de la célula huésped. Cómo se suministra la construcción de expresión a una célula y dónde permanece el ácido nucleico en la célula depende del tipo de construcción de expresión empleada.

Métodos para la ingeniería de células T y evaluación de las células T modificadas

En el presente documento se proporcionan ejemplos de métodos para la ingeniería de células T y la evaluación de las células T modificadas.

Transducción de retrovirus

Para la producción transitoria de retrovirus, se transfectan células 293T con las construcciones de polipéptidos quiméricas, junto con plásmidos que codifican gag-pol y envoltura RD 114 utilizando el reactivo de transfección GeneJuice (Novagen, Madison, WI). El virus se recoge entre 48 y 72 horas después de la transfección, se congela instantáneamente y se almacena a -80°C hasta uso. Para la producción transitoria de lentivirus, se transfectan células 293T con las construcciones junto con los plásmidos pLP1 (gag/pol), pLP2 (rev) y pLP/VSVG (VSVG env) utilizando GeneJuice. El virus se recoge de 48 a 72 horas después de la transfección, se congela instantáneamente y se almacena a -80°C hasta uso. Para la producción de retrovirus a gran escala, se genera una línea productora de retrovirus derivada de FLYRD 18 estable mediante múltiples transducciones con sobrenadante retroviral transitorio seudotipado de VSV-G. Las células FLYRD18 con la expresión más alta del transgén se clasifican en células individuales y el clon que produce el título de virus más alto se expande y se utiliza para producir virus para la transducción de linfocitos. La expresión transgénica, la función y el título retroviral de este clon se mantienen durante el cultivo continuo durante más de 8 semanas. Las placas de 24 pocillos no tratadas con cultivo de tejidos se recubren con $7\text{ }\mu\text{g/ml}$ de retronectina (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japón) durante 1 hora a 37°C o durante la noche a 4°C . Los pocillos se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se recubren con sobrenadante retroviral al incubar la placa con 1.5 ml de sobrenadante durante 30 minutos a 37°C . Posteriormente, los blastos de células T se colocan en placas a 5×10^5 células por pozo en sobrenadante viral suplementado con 100 U/ml de IL-2. La transducción se realiza durante un período de 60 horas. Después de la transducción, las células se recogen y fenotizan para la expresión de CD19 o GFP mediante citometría de flujo.

Citotoxicidad de las células T transducidas

La actividad citotóxica de cada estirpe de células T transducida se evalúa en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr de 4 horas, como se presentó anteriormente. Células T transducidas con retrovirus o lentivirus y comparadas con células diana marcadas con ^{51}Cr , incluidos linfocitos autólogos estimulados con fitohemaglutinina (PHA) (blastos de PHA), LNCaP, PC3 o DU145 y estirpes celulares de cáncer A549, y PSMA humano que expresa A549 transgénico (A549-PSMA). Se utilizan células diana incubadas en medio completo o Triton X-100 al 1% (Sigma, St Louis, MO) para determinar la liberación espontánea y máxima de ^{51}Cr , respectivamente. El porcentaje medio de lisis específica de pocillos por triplicado se calculó como $100 \times (\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$. Además de los ensayos de liberación de cromo, se realizan experimentos de cocultivo con. En el presente documento, las estirpes celulares LNCaP, PC3, DU145, A549 y A549-PSMA se transducen para expresar mOrange fluorescente y se utilizan como células diana. Las células tumorales que expresan mOrange se cocultivan con células T no transducidas o modificadas en una relación de 1:10 de células tumorales a células T en presencia de IL-2 (50 U/ml) en medio completo. Después de 24 horas, las células T se estimulan con AP1903 100 nM . Después de 72 horas, las células se recolectan, cuentan y marcan con CD3 para detectar células T y el porcentaje de células tumorales mOrange se analiza mediante citometría de flujo (LSRII; BD).

Fenotipado y estado de activación de las células T transducidas

El fenotipo de la superficie celular de las células T transducidas se investiga utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD27, CD28, CD44, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD80, CD83, CD86, CD95, CD127, CD134, CD137, HLA-ABC y HLA-DR. El fenotipado se realiza con y sin AP1903 100 nM . En cada experimento se utilizan controles de isotipo coincidentes apropiados y las células se analizan con un citómetro de flujo LSRII (BD). La expresión del polipéptido quimérico se valora utilizando anti-F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA).

Análisis de la producción de citocinas de células T transducidas

La concentración de interferón- γ (IFN- γ), IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 y factor de necrosis tumoral. α (TNF α) en sobrenadantes de cultivos de células T antes y después (24 horas) de la estimulación con AP1903 100 nM se mide utilizando la Matriz de Perlas citométricas de citocinas Th1/Th2 humanas (BD Pharmingen). La producción de citocinas inducida en los sobrenadantes del cultivo se valida mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA; R&D Systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Proliferación de células T transducidas

El efecto proliferativo de la activación inducida por AP1903 se evalúa al medir el crecimiento celular de células T transducidas y no transducidas después de la exposición a AP1903. Las células T se marcan con diacetato de carboxifluoresceína 10 μ M, succinimidil éster (CFSE) durante 10 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavan en PBS y luego se resuspenden en medios Cellgenix DC. 1×10^6 Las células T modificadas o no transducidas marcadas con CFSE se cultivan posteriormente en medio Cellgenix DC solo, o se estimulan con AP1903 100 nM. Después de 5 días, las células se recogen y se marcan con CD3-PerCP.Cy5.5 y CD19-PE y se analizan mediante citometría de flujo para la dilución de CFSE.

Para evaluar si las inmunoglobulinas solubles afectan la proliferación y expansión de los linfocitos T transducidos, las células se cultivan a 1×10^5 células/pocillo con diluciones en serie de plasma humano obtenido de donantes sanos o diluciones en serie de inmunoglobulinas humanas purificadas (Jackson ImmunoResearch) sin adición de citocinas exógenas. Después de 72 horas, las células se pulsan con 1 μ Ci (0.037 MBq) de metil-3[H]timidina (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se cultivan durante 15 horas adicionales. A continuación, las células se recogieron en filtros y se secaron, y se midieron los recuentos por minuto en un contador de centelleo β (TriCarb 2500 TR; Packard BioScience, Meriden, CT). Los experimentos se realizan por triplicado. En otros experimentos, los linfocitos T de control y modificados se cultivan con medios solos o con medios en los que se agregan diluciones en serie de plasma o inmunoglobulinas purificadas cada dos días. A continuación, las células se cuentan cada tercer día utilizando la exclusión con azul de tripán.

Activación de células T ex vivo y administración a un sujeto humano

En este ejemplo se presentan métodos de uso de células T modificadas, tales como células T modificadas con TCR recombinante específico de PRAME, que pueden o no comprender polinucleótidos que codifican polipéptidos quiméricos adicionales, tales como los polipéptidos de Caspasa-9 quiméricos discutidos en el presente documento, para terapia humana.

Materiales y métodos

Generación a gran escala de células T modificadas genéticamente

Las células T se generan a partir de voluntarios sanos, utilizando métodos estándar. Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos o pacientes con cáncer se activan para su expansión y transducción utilizando α CD3 y α CD28 solubles (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las PBMC se resuspenden en medios Cellgenix DC complementados con 100 U/ml de IL-2 (Cellgenix) a 1×10^6 células/ml y se estimularon con 0.2 μ g/ml de anticuerpo α CD3 y 0.5 μ g/ml de anticuerpo soluble α CD28.

A continuación, las células se cultivan a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 4 días. El día cuatro, se agrega 1 ml de medio fresco que contiene IL-2. El día 7, las células se recolectan y se resuspenden en medio Cellgenix DC para la transducción.

Plásmido y retrovirus

Las composiciones y métodos del presente ejemplo se pueden modificar para incluir vectores lentivirales que codifican TCR recombinante específico de PRAME como se discute en el presente documento. El plásmido SFG consiste en un polipéptido quimérico inducible ligado, a través de una secuencia escindible similar a 2A, a CD19 humano truncado. El polipéptido quimérico inducible consiste en una proteína de unión a FK506 humana (FKBP12; GenBank AH002 818) con una mutación F36V, conectada a través de un conector Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly al polipéptido quimérico humano. La mutación F36V aumenta la afinidad de unión de FKBP12 al homodimerizador sintético, AP20187 o AP1903. La secuencia similar a 2A, "T2A", codifica un péptido de 20 aminoácidos del virus del insecto Theisea asigna, que media > 99 % en la escisión entre un residuo de glicina y prolina terminal, lo que da como resultado 19 aminoácidos adicionales en el terminal C terminal del polipéptido quimérico inducible y un residuo de prolina adicional en el terminal N de CD19. CD19 consiste en CD19 de longitud completa (GenBank NM 001770) truncado en el aminoácido 333 (TDPTRRF), que acorta el dominio intracitoplasmático de 242 a 19 aminoácidos y elimina todos los residuos de tirosina conservados que son sitios potenciales para la fosforilación.

Un retrovirus seudotipado del virus de la leucemia del simio Gibbon (Gal-V) que produce un clon PG13 estable se fabrica mediante la transfección transitoria de la estirpe celular Phoenix Eco (producto ATCC #SD3444; ATCC, Manassas, VA) con el plásmido SFG. Esto produce retrovirus Eco-pseudotipados. La estirpe celular de empaque de PG13 (ATCC) se transduce tres veces con retrovirus ecopseudotipados para generar una línea productora que contenía múltiples integrantes provirales del plásmido SFG por célula. Se realiza la clonación de células individuales y el clon PG13 que produjo el título más alto se expande y se utiliza para la producción de vectores.

Transducción retroviral

El medio de cultivo para la activación y expansión de células T es el medio Cellgenix DC sin suero (Cellgenix) complementado con 100 U/ml de IL-2 (Cellgenix). Las células T se activan con anti-CD3 y anti-CD28 solubles (Miltenyi

Biotec) durante 7 días antes de la transducción con el vector retroviral. La selección inmunomagnética de Δ CD19, si es necesaria, se realiza el día 4 después de la transducción; la fracción positiva se expandió durante 2 días más y se criopreservó.

5 Aumento de la producción de células aloagotadas modificadas genéticamente

El aumento del proceso de transducción para aplicaciones clínicas utiliza matraces T75 no tratados con cultivo de tejidos (Nunc, Rochester, NY), que están recubiertos con 10 ml de anti-CD3 0.5 microgramos/ml y anti-CD28 0.2 μ g/ml o 10 ml de fibronectina 7 microgramos/ml a 4 °C durante la noche. También se utilizan bolsas de etileno propileno fluorado tratadas con corona para aumentar la adherencia celular (2PF-0072AC, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD). Las PBMC se siembran en matraces recubiertos con anti-CD3 y anti-CD28 a 1×10^6 células/ml en medio suplementado con 100 U/ml de IL-2. Para la transducción retroviral, los matraces o bolsas recubiertos con retronectina se cargan una vez con 10 ml de sobrenadante que contiene retrovirus durante 2 a 3 horas. Las células T activadas se siembran a 1×10^6 células/ml en medio fresco que contiene vector retroviral y medio de cultivo de células T en una relación de 3:1, suplementado con 100 U/ml de IL-2. Las células se recogen a la mañana siguiente y se expanden en matraces T75 o T175 tratados con cultivo de tejidos en medio de cultivo suplementado con 100 U/ml de IL-2 a una densidad de siembra de entre aproximadamente 5×10^5 células/ml a 8×10^5 células/ml.

20 Selección inmunomagnética de CD19

En el presente ejemplo, las células modificadas expresan una proteína marcadora CD19; se entiende que las células modificadas se pueden seleccionar utilizando marcadores distintos de CD19, o mediante otros métodos. La selección inmunomagnética para CD19 se puede realizar, en un ejemplo, 4 días después de la transducción. Las células se marcan con microesferas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos CD19 anti-humano monoclonales de ratón (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y se seleccionan en columnas MS o LS en experimentos a pequeña escala y en un dispositivo de selección automatizado CliniMacs Plus en experimentos a gran escala. Las células seleccionadas con CD19 se expanden durante 4 días adicionales y se criopreservan el día 8 después de la transducción. Estas células se denominan "células modificadas genéticamente".

30 Inmunofenotipificación y análisis de pentámeros

El análisis de citometría de flujo (software FACSCalibur y CellQuest; Becton Dickinson) se realiza utilizando los siguientes anticuerpos: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD56 y CD62L. Se encontró que CD19-PE (Clon 4G7; Becton Dickinson) proporciona una tinción óptima y se utilizó en todos los análisis posteriores. Se utiliza un control no transducido para establecer la puerta negativa para CD19.

Análisis estadístico

Se utiliza la prueba t de Student de 2 colas en pares para determinar la significación estadística de las diferencias entre las muestras. Todos los datos se representan como media $\pm$ 1 desviación estándar.

Métodos para tratar una enfermedad

En el presente documento se describen métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad en los que la administración de células, por ejemplo, mediante infusión, puede ser beneficiosa.

Células, tales como, por ejemplo, células T, linfocitos infiltrantes de tumores, células destructoras naturales, células T destructoras naturales o células progenitoras, tales como, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células del estroma mesenquimal, células madre, células madre pluripotentes, y las células madre embrionarias se pueden utilizar para la terapia celular. Las células pueden ser de un donante o pueden ser células obtenidas del paciente. Las células se pueden, por ejemplo, utilizar en regeneración, por ejemplo, para reemplazar la función de células enfermas. Las células también se pueden modificar para expresar un gen heterólogo de tal manera que los agentes biológicos se puedan suministrar en microentornos específicos tales como, por ejemplo, médula ósea enferma o depósitos metastásicos. Las células estromales mesenquimales también se han utilizado, por ejemplo, para proporcionar actividad inmunosupresora, y se pueden utilizar en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped y trastornos autoinmunitarios. Las células proporcionadas en la presente solicitud contienen un interruptor de seguridad que puede ser valioso en una situación en la que, después de la terapia celular, es necesario aumentar o disminuir la actividad de las células terapéuticas. Por ejemplo, cuando se proporcionan al paciente células T que expresan un receptor de células T, tal como un TCR dirigido a PRAME, en algunas situaciones puede haber un evento adverso, como toxicidad fuera de la diana. El cese de la administración del ligando devolvería las células T terapéuticas a un estado no activado, permaneciendo en un nivel de expresión bajo, no tóxico. O, por ejemplo, la célula terapéutica puede trabajar para disminuir la célula tumoral, o el tamaño del tumor, y puede que ya no sea necesaria. En esta situación, la administración del ligando puede cesar y las células terapéuticas ya no estarían activadas. Si las células tumorales regresan, o el tamaño del tumor aumenta después de la terapia inicial, el ligando se puede administrar nuevamente para activar aún más las células T que expresan TCR y volver a tratar al paciente.

Por “célula terapéutica” se entiende una célula utilizada para terapia celular, es decir, una célula administrada a un sujeto para tratar o prevenir una afección o enfermedad.

El término “dosis unitaria” en lo que respecta al inóculo se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de composición farmacéutica calculada para producir el efecto inmunoestimulador deseado en asociación con el diluyente requerido. Las especificaciones para la dosis unitaria de un inóculo están dictadas y dependen de las características únicas de la composición farmacéutica y el efecto inmunológico particular que se va a lograr.

Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica, tal como el ligando multimérico presentado en el presente documento, sería la cantidad que logra este resultado seleccionado de inducir la apoptosis en las células T que expresan caspasa-9, de tal manera que se destruyen más del 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 %, o menos del 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % de las células terapéuticas. El término también es sinónimo de “cantidad suficiente”. La cantidad eficaz cuando la composición farmacéutica es la célula T modificada también puede ser la cantidad que logre la respuesta terapéutica deseada, tal como la reducción del tamaño del tumor, la disminución del nivel de células tumorales o la disminución del nivel de células leucémicas, en comparación con el tiempo antes de que se administre el inductor del ligando.

La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se está tratando, la composición particular que se está administrando, el tamaño del sujeto y/o la gravedad de la enfermedad o afección. Uno puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una composición particular presentada en el presente documento sin necesidad de experimentación indebida.

Los términos “contactado” y “expuesto”, cuando se aplican a una célula, tejido u organismo, se utilizan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual se suministra la composición farmacéutica y/u otro agente, tal como por ejemplo, un agente quimioterapéutico o radioterapéutico, a una célula, tejido u organismo diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula, tejido u organismo diana. Para lograr la destrucción o estasis celular, la composición farmacéutica y/o el(los) agente(s) adicional(es) se suministra(n) a una o más células en una cantidad combinada eficaz para destruir la(s) célula(s) o evitar que se dividan.

La administración de la composición farmacéutica puede preceder, coincidir con y/o seguir a otro(s) agente(s) en intervalos que varía(n) desde minutos hasta semanas. En los ejemplos en los que la composición farmacéutica y otro(s) agente(s) se aplican por separado a una célula, tejido u organismo, generalmente se aseguraría de que no transcurriera un período de tiempo significativo entre los momentos de cada suministro, de tal manera que la composición farmacéutica y el agente(s) aún podría ejercer un efecto combinado ventajoso sobre la célula, el tejido o el organismo. Por ejemplo, en tales casos, se contempla que uno puede poner en contacto la célula, tejido u organismo con dos, tres, cuatro o más modalidades sustancialmente simultáneamente (es decir, en menos de aproximadamente un minuto) con la composición farmacéutica. En otros ejemplos, se pueden administrar uno o más agentes dentro de sustancialmente simultáneamente, aproximadamente 1 minuto, a aproximadamente 24 horas a aproximadamente 7 días a aproximadamente 1 a aproximadamente 8 semanas o más, y cualquier rango derivable en esto, antes de y/o después de administrar el vector de expresión. Todavía adicionalmente, se pueden emplear varios regímenes de combinación de la composición farmacéutica presentada en el presente documento y uno o más agentes.

Tratamiento terapéutico optimizado y personalizado

El programa de dosificación y administración de las células modificadas se puede optimizar al determinar el nivel de la enfermedad o afección que se va a tratar. Por ejemplo, se puede determinar el tamaño de cualquier tumor sólido remanente, o el nivel de células diana tales como, por ejemplo, células tumorales o células leucémicas, que permanecen en el paciente.

Por ejemplo, determinar que un paciente tiene niveles clínicamente relevantes de células tumorales, o un tumor sólido, después de la terapia inicial, proporciona una indicación al médico de que puede ser necesario administrar las células T modificadas. En otro ejemplo, determinar que un paciente tiene un nivel reducido de células tumorales o un tamaño tumoral reducido después del tratamiento con las células modificadas puede indicarle al médico que no se necesita una dosis adicional de las células modificadas. De manera similar, después del tratamiento con las células modificadas, la determinación de que el paciente continúa exhibiendo síntomas de enfermedad o afección, o sufre una recaída de los síntomas, puede indicar al médico que puede ser necesario administrar al menos una dosis adicional de células modificadas.

El término “dosificación” pretende incluir tanto la cantidad de la dosis como la frecuencia de administración, tal como, por ejemplo, el momento de la siguiente dosis. El término “nivel de dosificación” se refiere a la cantidad de células modificadas administradas en relación con el peso corporal del sujeto.

En ciertas realizaciones, las células se encuentran en un animal, tal como un humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor. El sujeto puede ser, por ejemplo, un animal, tal como un mamífero, por ejemplo, un primate humano, no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor. El sujeto puede ser, por ejemplo,

un humano, por ejemplo, un paciente que padezca una enfermedad infecciosa y/o un sujeto que esté inmunocomprometido o padezca una enfermedad hiperproliferativa.

Por lo tanto, por ejemplo, en ciertos ejemplos, los métodos comprenden determinar la presencia o ausencia de un aumento del tamaño del tumor y/o aumento del número de células tumorales en un sujeto en relación con el tamaño del tumor y/o el número de células tumorales tras la administración de las células modificadas o del ácido nucleico, y administrar una dosis adicional de las células modificadas o del ácido nucleico al sujeto en caso de que se determine la presencia de un aumento del tamaño del tumor y/o aumento del número de células tumorales. Los métodos también comprenden, por ejemplo, determinar la presencia o ausencia de un aumento de células leucémicas en el sujeto en relación con el nivel de células leucémicas después de la administración de las células o ácidos nucleicos modificados, y administrar una dosis adicional de las células modificadas o ácido nucleico al sujeto en el caso de que se determine la presencia de un aumento de células leucémicas en el sujeto. En estos ejemplos, por ejemplo, el paciente se trata inicialmente con las células terapéuticas o el ácido nucleico de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento. Después del tratamiento inicial, el tamaño del tumor, el número de células tumorales o el número de células leucémicas, por ejemplo, pueden disminuir en relación con el tiempo anterior al tratamiento inicial. En un momento determinado después de este tratamiento inicial, se examina de nuevo al paciente, o se puede monitorizar continuamente al paciente en busca de síntomas de la enfermedad. Si se determina que el tamaño del tumor, el número de células tumorales o el número de células leucémicas, por ejemplo, aumentan en relación con el tiempo justo después del tratamiento inicial, entonces las células modificadas o el ácido nucleico se pueden administrar por una dosis adicional. Este programa de monitorización y tratamiento puede continuar teniendo en cuenta que las células terapéuticas que expresan los receptores de células T dirigidos a PRAME permanecen en el paciente.

En otros ejemplos, después de la administración de las células modificadas o el ácido nucleico, en el que las células modificadas o el ácido nucleico expresan el polipéptido de caspasa-9 inducible, en caso de que sea necesario reducir el número de células modificadas o células modificadas in vivo, el ligando multimérico se puede administrar al paciente. En estos ejemplos, los métodos comprenden determinar la presencia o ausencia de un síntoma o afección negativa, como la enfermedad del injerto contra el huésped, o toxicidad fuera de la diana, y administrar una dosis del ligando multimérico. Los métodos pueden comprender además controlar el síntoma o la afección y administrar una dosis adicional del ligando multimérico en caso de que persista el síntoma o la afección. Este programa de monitorización y tratamiento puede continuar mientras las células terapéuticas que expresan los TCR dirigidos a PRAME permanecen en el paciente.

Una indicación de ajustar o mantener una dosis de fármaco posterior, tal como, por ejemplo, una dosis posterior de las células modificadas o ácido nucleico, y/o la dosificación de fármaco posterior, se puede proporcionar de cualquier manera conveniente. Se puede proporcionar una indicación en forma tabular (por ejemplo, en un medio físico o electrónico) en algunas realizaciones. Por ejemplo, el tamaño de la célula tumoral, o el número o nivel de células tumorales en una muestra se puede proporcionar en una tabla, y un médico puede comparar los síntomas con una lista o tabla de estadios de la enfermedad. Entonces, el médico puede identificar en la tabla una indicación para la dosis de fármaco posterior. En ciertas realizaciones, una indicación se puede presentar (por ejemplo, visualizar) por un ordenador, después de que los síntomas se proporcionen al ordenador (por ejemplo, ingresados en la memoria del ordenador). Por ejemplo, esta información se puede proporcionar a un ordenador (por ejemplo, ingresada en la memoria del ordenador por un usuario o transmitida a un ordenador a través de un dispositivo remoto en una red de ordenadores), y el software en el ordenador puede generar una indicación para ajustar o mantener una dosis de fármaco posterior y/o proporcionar la cantidad de la dosis de fármaco posterior.

Una vez que se determina una dosis posterior en base a la indicación, un médico puede administrar la dosis posterior o proporcionar instrucciones para ajustar la dosis a otra persona o entidad. El término “médico”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tomador de decisiones, y un médico es un profesional médico en ciertas realizaciones. Un tomador de decisiones puede ser un ordenador o una salida de programa de ordenador visualizada en algunas realizaciones, y un proveedor de servicios de salud puede actuar sobre la indicación o dosis de fármaco posterior visualizada por el ordenador. Un tomador de decisiones puede administrar la dosis posterior directamente (por ejemplo, infundir la dosis subsiguiente al sujeto) o de forma remota (por ejemplo, un tomador de decisiones puede cambiar de forma remota los parámetros de la bomba).

Los métodos divulgados en el presente documento incluyen, sin limitación, el suministro de una cantidad eficaz de una célula activada, un ácido nucleico o una construcción de expresión que codifica la misma. Una “cantidad eficaz” de la célula activada, ácido nucleico o construcción de expresión, en general, se define como la cantidad suficiente para lograr de forma detectable y repetida el resultado deseado declarado, por ejemplo, para mejorar, reducir, minimizar o limitar el grado de la enfermedad o sus síntomas. Pueden aplicarse otras definiciones más rigurosas, que incluyen la eliminación, erradicación o cura de la enfermedad. En algunas realizaciones, puede haber una etapa de monitorización de los biomarcadores u otros síntomas de la enfermedad, tal como el tamaño del tumor o la expresión del antígeno tumoral, para evaluar la eficacia del tratamiento y controlar la toxicidad.

En realizaciones adicionales, la construcción de expresión y/o el vector de expresión se pueden utilizar como una composición o sustancia que activa las células. Dicha composición que “activa las células” o “mejora la actividad de las células” se refiere a la capacidad de estimular una o más actividades asociadas con las células. Por ejemplo, una composición, como la construcción de expresión o el vector de los presentes métodos, puede estimular la regulación al

alza de moléculas coestimuladoras sobre las células, inducir la translocación nuclear de NF- κ B en las células, activar los receptores de tipo toll en las células u otras actividades que implican citocinas o quimiocinas.

La construcción de expresión, el vector de expresión y/o las células transducidas pueden potenciar o contribuir a la eficacia de una vacuna, por ejemplo, potenciando la inmunogenicidad de antígenos más débiles, tal como antígenos altamente purificados o recombinantes, reduciendo la cantidad de antígeno necesaria para una respuesta inmunitaria, reduciendo la frecuencia de la inmunización necesaria para proporcionar inmunidad protectora, mejorando la eficacia de las vacunas en sujetos con respuestas inmunitarias reducidas o debilitadas, tal como recién nacidos, ancianos e individuos inmunocomprometidos, y potenciando la inmunidad en un tejido diana, como la inmunidad de las mucosas, o promover la inmunidad humoral o mediada por células al provocar un perfil de citocinas particular.

En ciertas realizaciones, la célula también se pone en contacto con un antígeno. A menudo, la célula se pone en contacto con el antígeno ex vivo. A veces, la célula se pone en contacto con el antígeno in vivo. En algunas realizaciones, la célula está en un sujeto y se genera una respuesta inmunitaria contra el antígeno. A veces, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos (CTL). En ocasiones, la respuesta inmunitaria se genera contra un antígeno tumoral. En ciertas realizaciones, la célula se activa sin la adición de un adyuvante.

En ciertos ejemplos, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo y se administra al sujeto por administración intravenosa. En otros ejemplos, la célula se administra utilizando administración intradérmica. En algunos ejemplos, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo y se administra al sujeto mediante administración subcutánea. A veces, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo. A veces, la célula se transduce con el ácido nucleico in vivo.

En ciertos ejemplos, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo y se administra al sujeto mediante administración intradérmica y, a veces, la célula se transduce con el ácido nucleico ex vivo y se administra al sujeto mediante administración subcutánea. El antígeno puede ser un antígeno tumoral y la respuesta inmunitaria de CTL se puede inducir mediante la migración de la célula a un ganglio linfático de drenaje. Un antígeno tumoral es cualquier antígeno tal como, por ejemplo, un péptido o polipéptido, que desencadena una respuesta inmunitaria en un huésped. El antígeno tumoral puede ser un antígeno asociado a un tumor, que está asociado con una célula tumoral neoplásica.

En algunas realizaciones, un individuo o sujeto inmunocomprometido es un sujeto que tiene una respuesta inmunitaria reducida o debilitada. Dichos individuos también pueden incluir un sujeto que se haya sometido a quimioterapia o cualquier otra terapia que haya resultado en un sistema inmunitario debilitado, un receptor de trasplante, un sujeto que actualmente toma inmunosupresores, un individuo que envejece o cualquier individuo que tenga una reducción y/o alteración de las células auxiliares T CD4. Se contempla que los presentes métodos se pueden utilizar para potenciar la cantidad y/o la actividad de las células auxiliares T CD4 en un sujeto inmunocomprometido.

Antígenos

Al ensayar la activación de células T in vitro o ex vivo, los antígenos diana se pueden obtener o aislarse de diversas fuentes. El antígeno diana, como se utiliza en el presente documento, es un antígeno o un epítipo inmunológico en el antígeno, que es crucial en el reconocimiento inmunitario y la eliminación o el control final del agente que causa la enfermedad o el estado de la enfermedad en un mamífero. El reconocimiento inmunitario puede ser celular y/o humoral. En el caso de patógenos intracelulares y cáncer, el reconocimiento inmunitario puede ser, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T. El antígeno diana del presente documento puede comprender, por ejemplo, PRAME. Los receptores de células T pueden unirse a un epítipo o polipéptido derivado de PRAME solo o en el contexto de un complejo péptido-MHC, por ejemplo, una molécula de péptidos presentada como parte de un complejo MHC con una molécula Clase I de HLA. Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se unen a los TCR y los correceptores CD4/CD8 en los linfocitos T; las moléculas del MHC también presentan un fragmento de polipéptido, o epítipo, que interactúa con el TCR. En general, las moléculas Clase I de MHC interactúan con el receptor CD8 y las moléculas de clase II interactúan con el receptor CD4. Por lo tanto, en la presente solicitud, por "se une específicamente a PRAME", tal como, por ejemplo, cuando las regiones CDR3 de un TCR, o un TCR se une específicamente a PRAME o a un antígeno diana, se entiende que las regiones CDR3 solas, como parte de un TCR, como parte de un TCR recombinante que comprende secuencias de polipéptidos heterólogos, o como parte de un polipéptido heterólogo, puede unirse específicamente a PRAME, un epítipo o polipéptido derivado de PRAME, o el epítipo o polipéptido derivado de PRAME como parte de un complejo péptido-MHC, por ejemplo, un complejo Clase I de HLA, o, por ejemplo, como parte de un complejo péptido-MHC que incluye una molécula A2.01 Clase I de HLA. Las regiones CDR3 de los polipéptidos alfa y beta juntos reconocen o se unen al complejo péptido-MHC, se entiende que otras regiones TCR u otros polipéptidos pueden contribuir a esta unión. Por lo tanto, las regiones TCR CDR3 discutidas en el presente documento que "se unen específicamente" a PRAME, tienen afinidades de unión específicas por complejos de péptido PRAME-MHC, en el que el MHC, por ejemplo, es una molécula HLA Clase I, por ejemplo, una molécula A2.01 Clase I de HLA.

El antígeno diana se puede derivar o aislar de, por ejemplo, un microorganismo patógeno tal como virus, que incluye el VIH, (Korber et al, eds HIV Molecular Immunology Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex. 1977) gripe, herpes simple, virus del papiloma humano (Patente de EE.UU. No. 5,719,054), Hepatitis B (Patente de EE.UU. No. 5,780,036), Hepatitis C (Patente de EE.UU. No. 5,709,995), EBV, Citomegalovirus (CMV) y similares. El antígeno diana se puede derivar o aislar de bacterias patógenas tales como, por ejemplo, de Chlamydia (Patente de EE.UU. No.

5,869,608), Mycobacteria, Legionella, Meningioccocus, Streptococcus del grupo A, Salmonella, Listeria, Hemophilus influenzae (Patente de EE.UU. No. 5,955,596) y similares).

El antígeno diana se puede derivar o aislar de, por ejemplo, levadura patógena que incluye Aspergillus, Candida invasiva (Patente de EE.UU. No. 5,645,992), Nocardia, Histoplasmosis, Cryptosporidia y similares.

El antígeno diana se puede derivar o aislar de, por ejemplo, un protozoo patógeno y parásitos patógenos, que incluyen, pero no se limitan a, Pneumocystis carinii, Trypanosoma, Leishmania (Patente de EE.UU. No. 5,965,242), plasmodio (Patente de EE.UU. No. 5,589,343) y Toxoplasma gondii.

El antígeno diana incluye un antígeno asociado con un estado preneoplásico o hiperplásico. El antígeno diana también puede estar asociado con, o causar cáncer. En ciertas realizaciones, el antígeno diana es PRAME. Dicho antígeno diana puede ser, por ejemplo, antígeno específico de tumor, antígeno asociado a tumor (TAA) o antígeno específico de tejido, epítipo del mismo y agonista del epítipo del mismo. Dichos antígenos diana incluyen, pero no se limitan a, antígeno carcinoembrionario (CEA) y epítipos del mismo tales como CAP-1, CAP-1-6D y similares (Acceso GenBank No. M29540), MART-1 (Kawakami et al, J. Exp. Med. 180:347-352, 1994), MAGE-1 (Patente EE.UU. No. 5,750,395), MAGE-3, GAGE (Patente EE.UU. No. 5,648,226), GP-100 (Kawakami et al Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:6458-6462, 1992), MUC-1, MUC-2, oncogén ras con mutación puntual, oncogenes p53 normales y con mutación puntual (Hollstein et al Nucleic Acids Res. 22:3551-3555, 1994), PSMA (Israeli et al Cancer Res. 53:227-230, 1993), tirosinasa (Kwon et al PNAS 84:7473-7477, 1987) TRP-1 (gp75) (Cohen et al Nucleic Acid Res. 18:2807-2808, 1990; Patente EE.UU. No. 5,840,839), NY-ESO-1 (Chen et al PNAS 94: 1914-1918, 1997), TRP-2 (Jackson et al EMBOJ, 11:527-535, 1992), TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, (Patente EE.UU. No. 5,550,214), BRC-I, BRC-II, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, modificaciones de TAA y antígeno específico de tejido, variantes de empalme de TAA, agonistas de epítipos y similares. Otros TAA se pueden identificar, aislar y clonar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como aquellos divulgados en la Patente de EE.UU. No. 4,514,506. El antígeno diana también puede incluir uno o más factores de crecimiento y variantes de empalme de cada uno.

Un antígeno se puede expresar con mayor frecuencia en células cancerosas que en células no cancerosas. El antígeno puede resultar del contacto de la célula modificada con un antígeno de membrana específico de próstata, por ejemplo, un antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) o un fragmento del mismo.

El antígeno prostático (PA001) es una proteína recombinante que consiste en la porción extracelular del antígeno PSMA. El PSMA es una proteína de membrana de tipo II de ~100 kDa (84 kDa antes de la glicosilación, ~ 80 kDa como dímero) con actividades de neuropeptidasa y folato hidrolasa, pero actualmente no está clara la verdadera función del PSMA. Carter RE, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 93: 749-53, 1996; Israeli RS, et al., Cancer Res. 53: 227-30, 1993; Pinto JT, et al., Clin Cancer Res. 2: 1445-51, 1996.

La célula se puede poner en contacto con antígeno tumoral, tal como PSA, por ejemplo, polipéptido de PSMA, mediante varios métodos, que incluyen, por ejemplo, pulsar CD inmaduras con lisados tumorales no fraccionados, péptidos eluidos por MHC, proteínas de choque térmico (HSP) derivadas de tumores, antígenos asociados a tumores (TAA (péptidos o proteínas)), o transfección de DC con ARNm de tumor a granel, o ARNm que codifica para TAA (revisado en Gilboa, E. & Vieweg, J., Immunol Rev 199, 251-63 (2004); Gilboa, E, Nat Rev Cancer 4, 401-11 (2004)).

Para los organismos que contienen un genoma de ADN, se aísla del ADN genómico un gen que codifica un antígeno diana o un epítipo inmunológico de interés del mismo. Para organismos con genomas de ARN, el gen deseado se puede aislar a partir de copias de ADNc del genoma. Si se dispone de mapas de restricción del genoma, el fragmento de ADN que contiene el gen de interés se escinde mediante digestión con endonucleasas de restricción mediante métodos de rutina. En los casos en los que el gen deseado se haya clonado previamente, los genes se pueden obtener fácilmente a partir de los clones disponibles. Alternativamente, si se conoce la secuencia de ADN del gen, el gen se puede sintetizar mediante cualquiera de las técnicas convencionales para la síntesis de ácidos desoxirribonucleicos.

Los genes que codifican un antígeno de interés se pueden amplificar, por ejemplo, al clonar el gen en un huésped bacteriano. Para este propósito, se pueden utilizar varios vectores de clonación procarióticos. Los ejemplos son los plásmidos pBR322, pUC y pEMBL.

Los genes que codifican al menos un antígeno diana o un epítipo inmunológico del mismo se pueden preparar para su inserción en los vectores plasmídicos diseñados para la recombinación con un virus mediante técnicas estándar. En general, los genes clonados se pueden escindir del vector de clonación procariótico mediante digestión con enzimas de restricción. En la mayoría de los casos, el fragmento extirpado contendrá la región codificante completa del gen. El fragmento de ADN que lleva el gen clonado se puede modificar según sea necesario, por ejemplo, para hacer que los extremos del fragmento sean compatibles con los sitios de inserción de los vectores de ADN utilizados para la recombinación con un virus, luego se purifica antes de la inserción en los vectores en los sitios de escisión de endonucleasa de restricción (sitios de clonación).

La carga de antígeno de células, tal como, por ejemplo, células dendríticas, con antígenos, tal como, por ejemplo, un polipéptido del epítipo PRAME, se puede lograr, por ejemplo, al poner en contacto células, tales como, por ejemplo,

células dendríticas o células progenitoras con un antígeno, por ejemplo, al incubar las células con el antígeno. La carga también se puede lograr, por ejemplo, al incubar ADN (desnudo o dentro de un vector de plásmido) o ARN que codifica el antígeno; o con bacterias o virus recombinantes que expresan antígenos (por ejemplo, vectores vaccinia, viruela aviar, adenovirus o lentivirus). Antes de carga, el antígeno se puede conjugar covalentemente con un socio inmunológico que proporciona ayuda a las células T (por ejemplo, una molécula portadora). Alternativamente, una célula dendrítica se puede pulsar con un socio inmunológico no conjugado, por separado o en presencia del polipéptido. Los antígenos de células o moléculas del MHC se pueden obtener por acidución u otros métodos (véase Zitvogel L, et al., J Exp Med 1996. 183:87-97). Las células se pueden transducir o transfectar con la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína quimérica de acuerdo con los presentes métodos antes, después o al mismo tiempo que las células se cargan con el antígeno. En realizaciones particulares, la carga de antígeno es posterior a la transducción o transfección.

En realizaciones adicionales, la célula transducida se transfecta con ARNm de células tumorales. La célula transfectada transducida se administra a un animal para efectuar la respuesta inmunitaria de antígeno anti-tumoral de los linfocitos T citotóxicos y las células destructoras naturales y se regula utilizando FK506 dimérico y análogos de FK506 dimérico. El ARNm de la célula tumoral puede ser, por ejemplo, ARNm de una célula tumoral de próstata.

En algunas realizaciones, la célula transducida se puede cargar mediante pulsaciones con lisados de células tumorales. Las células transducidas pulsadas se administran a un animal para efectuar la respuesta inmunitaria de antígeno anti-tumoral de los linfocitos T citotóxicos y las células destructoras naturales y se regulan utilizando FK506 dimérico y análogos de FK506 dimérico. El lisado de células tumorales puede ser, por ejemplo, un lisado de células tumorales de próstata.

Respuesta de células inmunitarias y linfocitos T citotóxicos

Los linfocitos T se pueden activar por contacto con la célula que comprende el vector de expresión discutido en el presente documento, donde la célula ha sido inoculada, transfectada, pulsada o electrofusionada con un antígeno.

Las células T expresan un receptor de unión a antígeno único sobre su membrana (receptor de células T), que solo puede reconocer el antígeno en asociación con, o en el contexto de, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de otras células. Hay varias poblaciones de células T, tales como las células T colaboradoras y las células T citotóxicas. Las células T auxiliares y las células T citotóxicas se distinguen principalmente por su presentación de las glicoproteínas CD4 y CD8 unidas a la membrana, respectivamente. Las células T auxiliares secretan varias linfoquinas, que son cruciales para la activación de las células B, las células T citotóxicas, los macrófagos y otras células del sistema inmunitario. Por el contrario, una célula T CD8 ingenua que reconoce un complejo antígeno-MHC prolifera y se diferencia en una célula efectora denominada linfocito T CD8 citotóxico (CTL). Los CTL eliminan las células del cuerpo que muestran antígenos, tales como las células infectadas por virus y las células tumorales, al producir sustancias que provocan la lisis celular.

Las células modificadas transducidas o transfectadas con los ácidos nucleicos, vectores o composiciones del presente documento incluyen, por ejemplo, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T CD8+, células T CD4+, células T NK y células NK. Una célula modificada como se proporciona en el presente documento es normalmente una colección de células modificadas.

Por ejemplo, la actividad de CTL se puede valorar mediante métodos discutidos en el presente documento. Por ejemplo, los CTL pueden evaluarse en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién aisladas, en una estirpe celular expandida con IL-2 estimulada con fitohemaglutinina establecida a partir de PBMC (Bernard et al., AIDS, 12(16):2125-2139, 1998) o por células T aisladas de un sujeto previamente inmunizado y reestimuladas durante 6 días con DC infectadas con un vector de adenovirus que contiene el antígeno utilizando ensayos de microtoxicidad de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas estándar. Un tipo de ensayo utiliza células T clonadas. Se ha probado la capacidad de las células T clonadas para mediar tanto en la destrucción dependiente de la perforina como del ligando Fas en ensayos de citotoxicidad dirigidos (Simpson et al., Gastroenterology, 115(4):849-855, 1998). Los linfocitos T citotóxicos clonados mostraron destrucción independiente tanto de Fas como de perforina. Recientemente, se ha desarrollado un ensayo de liberación de deshidrogenasa in vitro que aprovecha un nuevo sistema de amplificación fluorescente (Page, B., et al., Anticancer Res. 1998 Jul-Aug;18(4A):2313-6). Este enfoque es sensible, rápido y reproducible y se puede utilizar ventajosamente para la reacción mixta de linfocitos (MLR). Se puede automatizar fácilmente para pruebas de citotoxicidad a gran escala utilizando la integridad de la membrana celular y, por lo tanto, se considera. En otro ensayo fluorométrico desarrollado para detectar citotoxicidad mediada por células, el fluoróforo utilizado es la molécula no tóxica AlamarBlue (Nociari et al., J. Immunol. Methods, 213(2): 157-167, 1998). The AlamarBlue se detiene con fluorescencia (es decir, rendimiento cuántico bajo) hasta que se produce la reducción mitocondrial, lo que luego da como resultado un aumento drástico en la intensidad de fluorescencia de AlamarBlue (es decir, aumento en el rendimiento cuántico). Se informa que este ensayo es extremadamente sensible, específico y requiere una cantidad significativamente menor de células efectoras que el ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar.

Otras células inmunitarias que pueden ser inducidas por los presentes métodos incluyen células destructoras naturales (NK). Las NK son células linfoides que carecen de receptores específicos de antígeno y forman parte del sistema inmunitario innato. Normalmente, las células infectadas suelen ser destruidas por las células T alertadas por partículas

extrañas unidas al MHC de la superficie celular. Sin embargo, las células infectadas por virus señalan la infección al expresar proteínas virales que son reconocidas por anticuerpos. Estas células se pueden destruir por NK. En las células tumorales, si las células tumorales pierden la expresión de las moléculas MHC I, entonces pueden ser susceptibles a las NK.

5

Formulaciones y rutas de administración a pacientes

10

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, será necesario preparar composiciones farmacéuticas (construcciones de expresión, vectores de expresión, proteínas fusionadas, células transducidas, células T activadas, células T transducidas y cargadas) en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, esto supondrá la preparación de composiciones que estén esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser dañinas para humanos o animales.

15

El ligando multimérico, tal como, por ejemplo, AP1903, se puede suministrar, por ejemplo, en dosis de aproximadamente 0.01 a 1 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0.05 a 0.5 mg/kg de peso del sujeto, 0.1 a 2 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0.05 a 1.0 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0.1 a 5 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0.2 a 4 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0.3 a 3 mg/kg de peso del sujeto, de aproximadamente 0.3 a 2 mg/kg de peso del sujeto, o aproximadamente 0.3 a 1 mg/kg de peso del sujeto, por ejemplo, aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg de peso del sujeto. En algunas realizaciones, el ligando se proporciona a 0.4 mg/kg por dosis, por ejemplo, a una concentración de 5 mg/ml. Se pueden proporcionar viales u otros recipientes que contengan el ligando en, por ejemplo, un volumen por vial de aproximadamente 0.25 ml a aproximadamente 10 ml, por ejemplo, aproximadamente 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, o 10 ml, por ejemplo, aproximadamente 2 ml.

20

25

En general, se puede desear emplear sales y tampones apropiados para hacer que los vectores de suministro sean estables y permitir la captación por parte de las células diana. También se pueden emplear tampones cuando se introducen células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas comprenden una cantidad eficaz del vector para las células, disuelto o disperso en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones también se denominan inóculos. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran a un animal o a un humano. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. se conoce el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar a las composiciones ingredientes activos suplementarios.

30

35

40

Las composiciones activas pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones se realizará a través de cualquier ruta común siempre que el tejido diana esté disponible a través de esa ruta. Esto incluye, por ejemplo, oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópico.

45

Alternativamente, la administración puede ser por inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Dichas composiciones normalmente se administrarían como composiciones farmacéuticamente aceptables, discutidas en el presente documento.

50

55

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma es estéril y es fluida en la medida en que existe una fácil jeringabilidad. Es estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En ciertos ejemplos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

60

65

Para la administración oral, las composiciones se pueden incorporar con excipientes y utilizarse en forma de enjuagues bucales y dentífricos no ingeribles. Se puede preparar un enjuague bucal incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (Solución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo puede incorporarse a un lavado antiséptico que contenga borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El ingrediente activo también se puede dispersar en dentífricos, que incluye, por ejemplo: geles, pastas, polvos y lodos. El ingrediente activo se puede agregar en una cantidad terapéuticamente eficaz a un dentífrico en pasta que puede incluir, por ejemplo, agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

Las composiciones se pueden formular en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad de tal manera que sea terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de células modificadas que expresan los TCR de PRAME discutidos en el presente documento puede ser una cantidad que reduce la cantidad o la concentración de una célula que expresa PRAME en un sujeto, según lo medido, por ejemplo, mediante ensayos discutidos en el presente documento in vivo en un sujeto, o en un ratón u otro modelo animal. Por tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para reducir el porcentaje o la cantidad de células que expresan PRAME en un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 %; una cantidad terapéuticamente eficaz también puede, por ejemplo, ser suficiente para dar como resultado una enfermedad estable, es decir, el número o la concentración de células que expresan PRAME no aumenta significativamente. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se puede tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, se pueden emplear medios acuosos estériles. Por ejemplo, una dosificación se podría disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregar a 1000 ml de líquido de hipodermoclasia o inyectarse en el lugar propuesto para la infusión (consulte, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15th edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente ocurrirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Más aún, para la administración humana, las preparaciones pueden cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad general y pureza según lo exigen los estándares de la Oficina de Productos Biológicos de la FDA.

El programa de administración se puede determinar según sea apropiado para el paciente y puede, por ejemplo, comprender un programa de dosificación en el que las células modificadas con TCR de PRAME se administren en la semana 0, seguido de la administración de células adicionales cuando sea necesario para obtener un resultado terapéutico eficaz o, por ejemplo, en intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 para un total de, por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 semanas.

Si es necesario, el método puede incluir además leucoféresis adicionales para obtener más células para utilizar en el tratamiento.

Las células modificadas de la presente solicitud se pueden suministrar en una sola administración o múltiples administraciones de un número total de células de, por ejemplo, 0.25×10^6 ($\pm 20\%$) células/kg, 0.5×10^5 ($\pm 20\%$) células/kg, 0.75×10^5 ($\pm 20\%$) células/kg, 1×10^5 ($\pm 20\%$) células/kg, 0.3×10^6 ($\pm 20\%$) células/kg, 0.625×10^6 ($\pm 20\%$) células/kg, 1.25×10^6 ($\pm 20\%$) células/kg, 2.5×10^6 ($\pm 20\%$) células/kg, 5×10^6 ($\pm 20\%$) células/kg, 7.5×10^6 ($\pm 20\%$) células/kg, 1×10^7 ($\pm 20\%$) células/kg, 2.5×10^7 ($\pm 20\%$) células/kg, 5×10^7 ($\pm 20\%$) células/kg, 7.5×10^7 ($\pm 20\%$) células/kg, o 1×10^8 ($\pm 20\%$) células/kg de peso corporal del sujeto.

Cuando sea necesaria la activación o la inducción del cambio de caspasa-9, la administración de AP1903 u otro inductor químico se puede determinar según sea apropiado para el paciente y puede, por ejemplo, comprender un programa de dosificación en el que la primera dosis se administre en la semana 0 del inicio de la terapia CID, seguido de la administración de un inductor químico adicional cuando sea necesario para obtener un resultado terapéutico efectivo o, por ejemplo, a intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 a partir de entonces para un total de, por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 semanas.

Métodos para tratar una enfermedad

En el presente documento se describen métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad causada por una enfermedad hiperproliferativa.

Los estados preneoplásicos o hiperplásicos que se pueden tratar o prevenir utilizando la composición farmacéutica (células T transducidas, vector de expresión, construcción de expresión, etc.) incluyen, pero no se limitan a, estados preneoplásicos o hiperplásicos tales como pólipos de colon, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesiones de mama y similares.

Los cánceres, que incluyen los tumores sólidos, que se pueden tratar utilizando la composición farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, melanoma primario o metastásico, adenocarcinoma, carcinoma de células epidermoides, carcinoma de células adenoescamosas, timoma, melanoma uveal, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma

no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de colon, mieloma múltiple, neuroblastoma, NPC, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino y similares.

Otras enfermedades hiperproliferativas, que incluyen los tumores sólidos, que se pueden tratar utilizando las células T y otros sistemas de activación de células terapéuticas presentados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, osteoartritis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, restenosis, aterosclerosis, lesiones preneoplásicas (tales como hiperplasia adenomatosa y neoplasia intraepitelial prostática), carcinoma in situ, leucoplasia oral pilosa o psoriasis.

En el método de tratamiento, la administración de la composición farmacéutica (construcción de expresión, vector de expresión, proteína fusionada, células transducidas y células T activadas, células T transducidas y cargadas) puede ser para fines "profilácticos" o "terapéuticos". Cuando se proporciona profilácticamente, la composición farmacéutica se proporciona antes de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la composición farmacéutica sirve para prevenir o mejorar cualquier infección o enfermedad posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la composición farmacéutica se proporciona en el momento o después del inicio de un síntoma de infección o enfermedad. Por lo tanto, las composiciones presentadas en el presente documento pueden proporcionarse antes de la exposición anticipada a un agente causante de la enfermedad o a un estado patológico o después del inicio de la infección o la enfermedad. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento profiláctico de tumores sólidos tales como los que se encuentran en el cáncer o, por ejemplo, pero sin limitación, en el cáncer de próstata, utilizando los ácidos nucleicos y las células discutidos en el presente documento. Por ejemplo, se proporcionan métodos para prevenir o reducir profilácticamente el tamaño de un tumor en un sujeto que comprende administrar los ácidos nucleicos o las células discutidos en el presente documento, en los que los ácidos nucleicos o las células se administran en una cantidad eficaz para prevenir o reducir el tamaño de un tumor en un sujeto.

Los tumores sólidos de cualquier tejido u órgano se pueden tratar utilizando los presentes métodos, que incluyen, por ejemplo, cualquier tumor que exprese PSA, por ejemplo, PSMA, en la vasculatura, por ejemplo, tumores sólidos presentes en, por ejemplo, pulmones, huesos, hígado, próstata o cerebro, y también, por ejemplo, en mama, ovario, intestino, testículos, colon, páncreas, riñón, vejiga, sistema neuroendocrino, tejido blando, masa ósea y sistema linfático. Otros tumores sólidos que se pueden tratar incluyen, por ejemplo, glioblastoma y mieloma maligno.

El término "dosis unitaria" en lo que respecta al inóculo se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de composición farmacéutica calculada para producir el efecto inmunogénico deseado en asociación con el diluyente requerido. Las especificaciones para la dosis unitaria de un inóculo están dictadas y dependen de las características únicas de la composición farmacéutica y el efecto inmunológico particular que se va a lograr.

Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica sería la cantidad que consiga este resultado seleccionado de potenciación de la respuesta inmunitaria, y se podría determinar dicha cantidad. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar una deficiencia del sistema inmunitario podría ser la cantidad necesaria para provocar la activación del sistema inmunitario, dando como resultado el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica de antígeno tras la exposición al antígeno. El término también es sinónimo de "cantidad suficiente".

La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se está tratando, la composición particular que se está administrando, el tamaño del sujeto y/o la gravedad de la enfermedad o afección. Uno puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una composición particular presentada en el presente documento sin necesidad de experimentación indebida. Por lo tanto, por ejemplo, en un ejemplo, las células T u otras células transducidas se administran a un sujeto en una cantidad eficaz para, por ejemplo, inducir una respuesta inmunitaria o, por ejemplo, para reducir el tamaño de un tumor o reducir la cantidad de vasculatura tumoral.

A. Terapias de base genética

En ciertas realizaciones, se proporciona a una célula una construcción de expresión capaz de proporcionar un polipéptido de TCR recombinante, tal como, por ejemplo, polipéptidos de TCR recombinantes específicos de PRAME, en una célula T. La discusión de los vectores de expresión y los elementos genéticos empleados en los mismos se incorpora a esta sección como referencia. En ciertos ejemplos, los vectores de expresión pueden ser vectores virales, tales como adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, lentivirus del virus vaccinia y retrovirus. En otro ejemplo, el vector puede ser un vector de expresión encapsulado en lisosomas.

El suministro de genes se puede realizar tanto en situaciones in vivo como ex vivo. Para los vectores virales, generalmente se preparará una reserva de vectores virales. En la presente solicitud se presentan ejemplos de suministro de genes mediada por vectores virales ex vivo e in vivo. Para el suministro in vivo, dependiendo del tipo de virus y el título alcanzable, se suministrará, por ejemplo, aproximadamente $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^4$, $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^5$, $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^6$, $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^7$, $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^8$, $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^9$, $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^{10}$, $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^{11}$ o $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 \text{ o } 9 \times 10^{12}$ partículas infecciosas al paciente. Se pueden

extrapolar cifras similares para liposomas u otras formulaciones no virales al comparar las eficiencias de captación relativas. La formulación como una composición farmacéuticamente aceptable se discute a continuación. El ligando multimérico, tal como, por ejemplo, AP1903, se puede suministrar, por ejemplo, en dosis aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg de peso del sujeto.

B. Terapia basada en células

Otra terapia que se contempla es la administración de células T manipuladas por ingeniería, tal como, por ejemplo, la administración de células T transducidas. Las células T se pueden diseñar por ingeniería in vitro. La formulación como una composición farmacéuticamente aceptable se discute en el presente documento.

En terapias basadas en células, las células manipuladas por ingeniería se pueden, por ejemplo, transducir con vectores retrovirales o lentivirales que codifican ácidos nucleicos de antígenos diana o transfectarse con ácidos nucleicos de antígenos diana, tales como ARNm o ADN o proteínas; pulsado con lisados celulares, proteínas o ácidos nucleicos; o electrofundido con células. Las células, proteínas, lisados celulares o ácidos nucleicos pueden derivar de células, tales como células tumorales u otros microorganismos patógenos, por ejemplo, virus, bacterias, protozoos, etc.

C. Terapias combinadas

Con el fin de aumentar la eficacia de los vectores de expresión presentados en el presente documento, puede ser deseable combinar estas composiciones y métodos con un agente eficaz en el tratamiento de la enfermedad.

En ciertos ejemplos, los agentes anticancerígenos se pueden utilizar en combinación con los presentes métodos. Un agente "anticanceroso" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, al destruir una o más células cancerosas, inducir la apoptosis en una o más células cancerosas, reducir la tasa de crecimiento de una o más células cancerosas, reducir la incidencia o número de metástasis, reducir el tamaño de un tumor, inhibir el crecimiento de un tumor, reducir el suministro de sangre a un tumor o una o más células cancerosas, promover una respuesta inmunitaria contra una o más células cancerosas o un tumor, prevenir o inhibir la progresión de un cáncer, o aumentar la esperanza de vida de un sujeto con cáncer. Los agentes contra el cáncer incluyen, por ejemplo, agentes de quimioterapia (quimioterapia), agentes de radioterapia (radioterapia), un procedimiento quirúrgico (cirugía), agentes de inmunoterapia (inmunoterapia), agentes de terapia génica (terapia génica), terapia hormonal, otros agentes biológicos (bioterapia) y/o terapias alternativas.

En ejemplos adicionales, se pueden utilizar antibióticos en combinación con la composición farmacéutica para tratar y/o prevenir una enfermedad infecciosa. Dichos antibióticos incluyen, pero no se limitan a, amikacina, aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina), amoxicilina, anfotericina B, ampicilina, antimoniales, estibogluconato de atovaquona de sodio, azitromicina, capreomicina, cefotaxima, cefoxitina, ceftriaxona, cloranfenicol, claritromicina, clindamicina, clofazimina, cicloserina, dapsona, doxiciclina, etambutol, etionamida, fluconazol, fluoroquinolonas, isoniazida, itraconazol, kanamicina, ketoconazol, minociclina, ofloxacina), ácido para-aminosalicílico, pentamidina, polimixina definsinas, protionamida, pirazinamida, pirimetamina sulfadiazina, quinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina), rifabutina, rifampicina, esparfloxacina, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclinas, tiacetazona, trimetaprim-sulfametoxazol, viomicina o combinaciones de los mismos. Más generalmente, dicho agente se proporcionaría en una cantidad combinada con el vector de expresión eficaz para destruir o inhibir la proliferación de una célula cancerosa y/o un microorganismo. Este proceso puede implicar poner en contacto la(s) célula(s) con un(los) agente(s) y la composición farmacéutica al mismo tiempo o dentro de un período de tiempo en el que la administración separada de la composición farmacéutica y un agente a una célula, tejido u organismo produce un beneficio terapéutico deseado. Esto se puede lograr al poner en contacto la célula, el tejido o el organismo con una sola composición o formulación farmacológica que incluya tanto la composición farmacéutica como uno o más agentes, o al poner en contacto la célula con dos o más composiciones o formulaciones distintas, en la que una composición incluye la composición farmacéutica y la otra incluye uno o más agentes.

Los términos "contactado" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, tejido u organismo, se utilizan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual se suministra la composición farmacéutica y/u otro agente, tal como por ejemplo, un agente quimioterapéutico o radioterapéutico a una célula, tejido u organismo diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula, tejido u organismo diana. Para lograr la destrucción o estasis celular, la composición farmacéutica y/o el(los) agente(s) adicional(es) se suministra(n) a una o más células en una cantidad combinada eficaz para destruir la(s) célula(s) o evitar que se dividan.

La administración de la composición farmacéutica puede preceder, coincidir con y/o seguir a otro(s) agente(s) en intervalos que varían desde minutos hasta semanas. En los ejemplos en los que la composición farmacéutica y otro(s) agente(s) se aplican por separado a una célula, tejido u organismo, generalmente se aseguraría de que no transcurriera un período de tiempo significativo entre los momentos de cada suministro, de tal manera que la composición farmacéutica y el agente(s) aún podría ejercer un efecto combinado ventajoso sobre la célula, el tejido o el organismo. Por ejemplo, en tales casos, se contempla que uno puede poner en contacto la célula, tejido u organismo con dos, tres, cuatro o más modalidades sustancialmente simultáneamente (es decir, en menos de aproximadamente un minuto) con la composición farmacéutica. En otros ejemplos, se pueden administrar uno o más agentes dentro de sustancialmente simultáneamente, aproximadamente 1 minuto, a aproximadamente 24 horas a aproximadamente 7 días a aproximadamente 1 a

aproximadamente 8 semanas o más, y cualquier rango derivable en esto, antes de y/o después de administrar el vector de expresión. Todavía adicionalmente, se pueden emplear varios regímenes de combinación de la composición farmacéutica presentada en el presente documento y uno o más agentes.

5 En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico puede ser un quimioterapéutico que agota los linfocitos. En otros ejemplos, el agente quimioterapéutico puede ser Taxotere (docetaxel), u otro taxano, tal como, por ejemplo, cabazitaxel. El quimioterapéutico se puede administrar antes, durante o después del tratamiento con las células y el inductor. Por ejemplo, el quimioterapéutico se puede administrar aproximadamente 1 año, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 meses, o 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 semanas o 1 semana antes de administrar la primera dosis de ácido nucleico
10 activado. O, por ejemplo, el quimioterapéutico se puede administrar aproximadamente 1 semana o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 semanas o 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 meses o 1 año después de administrar la primera dosis de células o inductor.

15 La administración de un agente quimioterapéutico puede comprender la administración de más de un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, se puede administrar cisplatino además de Taxotere u otro taxano, tal como, por ejemplo, cabazitaxel.

20 Los métodos que se presentan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, el suministro de una cantidad eficaz de una célula activada, un ácido nucleico o una construcción de expresión que codifica el mismo. Una "cantidad eficaz" de la composición farmacéutica, generalmente, se define como la cantidad suficiente para lograr de manera detectable y repetidamente el resultado deseado indicado, por ejemplo, para mejorar, reducir, minimizar o limitar la extensión de la enfermedad o sus síntomas. Pueden aplicarse otras definiciones más rigurosas, que incluye eliminación, erradicación o cura de la enfermedad. En algunas realizaciones puede haber una etapa de monitorización de los biomarcadores para evaluar la eficacia del tratamiento y controlar la toxicidad.

25 Un médico puede determinar una cantidad eficaz de la célula modificada, considerando el paciente individual. Los factores a considerar pueden incluir, por ejemplo, la extensión de la enfermedad o afección, el tamaño del tumor, la extensión de la infección, la metástasis, edad y peso. La dosificación y el número de administraciones se pueden determinar por el médico u otro clínico, al monitorizar al paciente en busca de síntomas de enfermedad o afección, y de respuestas a dosis previas, por ejemplo, al monitorizar el tamaño del tumor o el nivel o la concentración del antígeno tumoral. En ciertos ejemplos, las células modificadas se pueden administrar a una dosificación de 10^4 a 10^9 células modificadas/kg de peso corporal, 10^5 a 10^6 , 10^9 - 10^{11} , o 10^{10} - 10^{11} células modificadas/kg de peso corporal.

35 D. Estudio de aumento de dosis que evalúa la seguridad y la viabilidad de las células T que expresan TCR de PRAME en pacientes con neoplasias mieloides recidivante o resistentes

Los linfocitos T que expresan TCR de PRAME que comprenden un ácido nucleico codificante de caspasa-9 quimérico (Célula A) se pueden administrar a sujetos que tienen una afección o enfermedad asociada con la expresión del antígeno PRAME, por ejemplo, en sujetos que tienen una neoplasia mieloide. El interruptor de seguridad de caspasa-9 (iCasp9) está incluido en el diseño de la célula A, lo que proporciona un método para controlar el nivel de tratamiento o detener el tratamiento con las células T que expresan TCR de PRAME.

45 Fase I. Estudio abierto, no aleatorizado, de viabilidad, seguridad y búsqueda de dosis. Durante el estadio MTD de Fase I, el sujeto recibe una dosis de Célula A el día 0. El diseño consiste en 5 cohortes de Célula A que consisten en 3-6 sujetos por cohorte que se tratan con Célula A siguiendo un esquema de escalada/desescalada de 3+3 dosis. Durante la etapa de expansión de Fase Ib, los sujetos reciben la dosis más alta tolerada de Célula A el Día 0. La toxicidad descontrolada desencadenará el uso del fármaco dimerizador, rimiducid, que activa el interruptor suicida CaspaCIDE, eliminando de esta manera la Célula A PRAME reactiva a células T.

50 Diseño de dosificación:

- Si 1/3 experimenta una DLT en la dosis inicial (cohorte 3); otros tres sujetos se inscriben y tratan en la Cohorte 3. Los 3 pacientes iniciales se inscriben secuencialmente, con un seguimiento de 3 semanas después de cada paciente antes de inscribir a más pacientes. Todas las cohortes posteriores se pueden inscribir simultáneamente.
- 55 • Si 0/3 o 1/6 de los sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 3 (dosis inicial), entonces los sujetos subsiguientes se inscriben en la Cohorte 4. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 3; entonces los sujetos subsiguientes se inscriben en la Cohorte 2.
- Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la cohorte 4, entonces los sujetos subsiguientes se inscriben en la cohorte 5. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 4, entonces la Cohorte 3 se declara MTD y si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 3, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD.
- 60 • Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 5, entonces la Cohorte 5 se declara MTD si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 5, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 5, entonces la Cohorte 4 se declara como la MTD. Si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 4, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD.

• Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 2, entonces la Cohorte 2 se declara la MTD; si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 2, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 2; los sujetos subsiguientes se inscriben en la Cohorte 1.

5 • Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 1, entonces la Cohorte 1 se declara la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 1; entonces el estudio se detiene y los datos son evaluados por el Equipo de Estudio Clínico, que incluyen el patrocinador y los investigadores.

Las DLT para el tratamiento de la Célula A se definen a continuación:

10 Nuevos eventos adversos que ocurren en los primeros 21 días relacionados con la infusión de la Célula A

- Toxicidad hematológica de grado ≥ 5 relacionada con la Célula A;
- Toxicidad no hematológica de grado ≥ 3 , que incluye reacciones de hipersensibilidad y reacciones autoinmunitarias relacionadas con la infusión de Célula A

15 Los efectos del tratamiento se calculan en comparación con el valor de referencia utilizando los criterios del grupo de trabajo internacional.

Ejemplos de criterios de inclusión para un estudio de dosificación

- 20
1. Leucemia aguda: Pacientes con AML resistente o recidivante, distinta de la leucemia promielocítica aguda (APL)
 2. Los pacientes con un cariotipo monosomal o complejo se pueden inscribir en el momento de la biopsia del día 14 después de la quimioterapia de inducción, si se identifica enfermedad residual.
 3. Los pacientes deben expresar HLA-A2.01 y los blastos mieloides deben expresar PRAME.
 - 25 4. Recuento absoluto de linfocitos (ALC) $> 300/\text{mm}^3$ o $\text{CD}3^+ > 150$ células/ mm^3 .
 5. Los pacientes que han recaído y están más de 100 días después de un trasplante de células madre son elegibles a menos que tengan GVHD activo que requiera terapia inmunosupresora sistémica.
 6. AML o MDS recidivantes o resistentes

30 • Los pacientes con AML deben tener $> 5\%$ de blastos en la médula ósea al ingresar al estudio, sin causalidad alternativa (por ejemplo, regeneración de la médula ósea)

- AML recidivante o resistente de acuerdo con los Criterios del Grupo de Trabajo Internacional Modificado para la AML

35 • IPSS INT-2 o MDS de alto grado (RAEB-2) con 10-19 % de blastos que no responden a la terapia de hipometilación o IPSS INT-1, Int-2 o MDS de alto grado con recurrencia después de la respuesta inicial.

7. Edad > 18 años.

8. Esperanza de vida de al menos 2 meses.

40 9. Estado funcional ECOG: ≤ 2

10. Fuera de la terapia previa contra el cáncer durante al menos 14 días para los agentes citotóxicos previos del fármaco administrado previamente, antes de la primera administración del tratamiento del estudio, excepto la hidroxiurea proporcionada solo cuando sea necesaria para el control de la hiperleucocitosis. Las toxicidades clínicamente significativas persistentes de la quimioterapia previa no deben ser superiores al grado 1 en el momento de la inscripción.

45 Los agentes quimioterapéuticos se pueden proporcionar hasta 5 días antes de la reinfusión de células T si es necesario para controlar la enfermedad de crecimiento rápido.

11. Capaz de cumplir con los criterios institucionales para la recolección de aféresis de células T

12. Función renal:

50 1. Todos los pacientes deben tener una depuración de creatinina calculado > 40 ml/min de acuerdo con Cockcroft-Gault.

2. El análisis de orina de rutina no debe mostrar anomalías clínicamente significativas.

13. LFT adecuados: Bilirrubina total $\leq 3.0 \times$ los límites superiores normales institucionales (ULN) con bilirrubina directa $< 1.6 \times$ ULN.

55 14. ALT/AST y fosfatasa alcalina $< 5 \times$ ULN

15. Estado de coagulación aceptable:

- INR/PT ≤ 1.5 veces el límite superior normal (ULN)

- PTT < 1.5 veces ULN

60

Tabla 1: Nivel de dosis de la célula A en cada cohorte basado en el peso corporal real del sujeto

Grupo	Célula A
1	$0.3 \times 10^6 (\pm 20\%)$ células/kg
2	$0.625 \times 10^6 (\pm 20\%)$ células/kg
3 (dosis inicial)	$1.25 \times 10^6 (\pm 20\%)$ células/kg

4	$2.5 \times 10^6 (\pm 20 \%)$ células/kg
5	$5 \times 10^6 (\pm 20 \%)$ células/kg

LISTA DE ABREVIATURAS Y TÉRMINOS

	ABW	Peso corporal ajustado
5	AE	Acontecimiento adverso
	APC	Células presentadoras de antígenos
	BM	Médula ósea
	CR	Remisión completa
	CRF	Formularios de informe de casos
10	CRO	Organización de investigación de contratos
	CTL	Linfocitos T citotóxicos
	DFS	Supervivencia libre de enfermedad
	DLT	Toxicidad limitante de dosis
	eCRF	Formulario de informe de caso electrónico
15	EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
	EKG	electrocardiograma
	FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
	GCP	Buena práctica clínica
	G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
20	GMP	Buena práctica médica
	HAMA	Anticuerpo anti-ratón humano
	HIPAA	Ley de Responsabilidad y Portabilidad del Seguro de Salud (US)
	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
	HSCT	Trasplante de células madre hematopoyéticas
25	ICF	Formulario de consentimiento informado
	ICH	Conferencia Internacional sobre Armonización
	IMP	Producto médico en investigación
	IRB	Junta de revisión institucional
	IV	Intravenoso
30	KPS	Estado de desempeño de Karnofsky
	LN2	Nitrógeno líquido
	LVEF	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
	MACS	Clasificación celular activada magnéticamente
	MDS	Síndrome mielodisplásico
35	MHC	Complejo de histocompatibilidad mayor
	MRD	Enfermedad mínima residual
	MTD	Dosis máxima tolerada
	NCI CTCAE	Terminología común del Instituto Nacional del Cáncer para eventos adversos
	NK	Destructor natural
40	NR	Sin respuesta
	NRM	Mortalidad sin recaída
	OS	Supervivencia global
	PAgs	Fosfoantígenos no peptídicos
	PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
45	PBSC	Célula madre de sangre periférica
	PD	Enfermedad progresiva
	PR	Respuesta parcial
	RCR	Retrovirus competentes DE replicación
	SAE	Evento adverso grave
50	SDV	Verificación de datos de origen
	TCR	Receptor de células T
	TNC	Célula nuclear total
	TNF	Factor de necrosis tumoral
	TPHA	Prueba de hemaglutinación de Treponema pallidum
55	WHO	Organización Mundial de la Salud

Resumen

60 La leucemia mieloide aguda recidivante o resistente es una situación clínica desafiante para la supervivencia del paciente sin una ruta clara para determinar el manejo óptimo. Incluso con un manejo agresivo, la supervivencia general de la AML resistente a los 4 años es consistentemente baja: SWOG: 3 % a los 4 años para pacientes mayores de 60 años, HOVON-SAKK 7 % de supervivencia general a los 5 años para pacientes menores de 60 años y 4 % a los 2 años en pacientes mayores de 60 años. Un estudio de análisis retrospectivo de 594 pacientes con AML que se sometieron a una segunda terapia de rescate con terapias estándar, que incluyen el trasplante de células madre, informó una mediana de

supervivencia de 1.5 meses con una supervivencia de un año del 8 %. Los algoritmos estándar recomiendan HSCT o “ensayo clínico con agente nuevo” en pacientes con MDS con enfermedad progresiva (Sekerer, 2014). Claramente, existe una necesidad clínica no satisfecha de que los pacientes con neoplasias mieloides controlen su enfermedad a fin de calificar para un trasplante potencialmente curativo.

PRAME se expresa en AML con una alta frecuencia y en un nivel mucho más alto que el detectado en tejidos normales. Dado que cualquier efecto secundario fuera del tumor/en la diana se debe abordar mediante la activación del interruptor suicida CaspaCide y la eliminación de las células T de Célula A, la inmunoterapia de TCR es una estrategia de tratamiento potencial que debe evaluarse en pacientes “sin opción” con recaída o neoplasias mieloides resistentes.

En este protocolo de búsqueda de dosis, a los pacientes con AML recidivante o resistente o MDS resistente a agentes hipometilantes avanzados se les recolectarán células T autólogas mediante aféresis y se modificarán utilizando un retrovirus para expresar un receptor de células T transgénicas (TCR) que se dirige a PRAME en contexto de un elemento restrictivo HLA de clase I conocido, HLA A2.01. Las células se pueden reinfundir de acuerdo con un programa de búsqueda de dosis después de que se haya identificado que el paciente tiene una linfopenia adecuada para proporcionar la expansión homeostática del producto terapéutico de células T manipulado por ingeniería y transferido adoptivamente.

AML resistente primaria

Para los pacientes tratados inicialmente con quimioterapia de inducción agresiva (1 o 2 ciclos), entre el 20 % y el 40 % no obtendrán una remisión y se considera que tienen una enfermedad resistente primaria (Cheson 2004). La enfermedad resistente primaria se identifica con mayor frecuencia en pacientes con un cariotipo complejo o monosómico, o una AML secundaria relacionada con el tratamiento o AML que surge de trastornos hematológicos antecedentes, pero se puede observar en todas las estratificaciones de riesgo de enfermedad de AML. Aproximadamente el 10 % de los pacientes con AML menores de 60 años se identifican con un cariotipo monosómico dentro de sus clones leucémicos, mientras que este subtipo molecular se identifica cada vez más con la edad, con ~20 % de los pacientes mayores de 60 años que expresan este fenotipo de enfermedad resistente. Con quimioterapia de inducción agresiva, en pacientes menores de 60 años, la tasa de remisión es de aproximadamente 14 a 50 %, mientras que en pacientes mayores de 60 años, la tasa de remisión disminuye a 13 a 34 % (Breems, 2008; Lowenberg, 2009; Medeiros 2010).

AML recidivante

Igualmente decepcionantes son los resultados para los pacientes con AML recidivante. Aunque varía en los grupos de riesgo biológico y citogenético, entre el 30 y el 60 % de los pacientes con AML recidivante pueden obtener una segunda remisión con quimioterapia de rescate (Mangan, 2011) y los datos del MD Anderson Cancer Center demuestran una mediana de supervivencia de 5.6 meses con quimioterapia sola contra 11.7 meses en aquellos pacientes que pasaron a un trasplante de células madre (Armistead, 2009). Si los pacientes requieren una segunda terapia de rescate, los resultados son extremadamente malos. Un estudio de análisis retrospectivo de 594 pacientes con AML que se sometieron a una segunda terapia de rescate con terapias estándar, que incluye el trasplante de células madre, informó una mediana de supervivencia de 1.5 meses con una supervivencia de un año del 8 %. Cuando se analizó el subgrupo (13 %) de los que lograron una remisión completa (CR), la mediana de duración de la CR fue de 7 meses. En el análisis multivariado, se identificaron una serie de características de mal pronóstico, como edad > 60 años, duración inicial de CR < 12 meses y duración de la segunda CR < 6 meses (Giles, 2005). Es importante destacar que las terapias estándar no parecen tener un impacto favorable en los pacientes que recaen en < 12 meses (Kumar, 2011).

MDS

Los pacientes con síndrome mielodisplásico (MDS) que se han tratado con agentes hipometilantes y han tenido progresión de la enfermedad, o cuya enfermedad no ha respondido, tienen un pronóstico muy precario sin evidencia de beneficio de ninguna terapia sobre la atención de apoyo. Los algoritmos estándar recomiendan “ensayo clínico con agente nuevo” en esta situación (Sekerer, 2014). Varios grupos han identificado la expresión y sobreexpresión de PRAME en MDS. La expresión de PRAME en MDS se ha estudiado como un marcador de enfermedad de mayor riesgo y se han observado peores resultados, aunque esto no se ha validado en cohortes más grandes de pacientes. (Andrews, 2014).

Opciones de tratamiento en neoplasias mieloides recidivantes o resistentes

Trasplante

En pacientes con persistencia o recurrencia de AML, se considera que la leucemia no es sensible a la quimioterapia y se requieren estrategias de manejo alternativas. Actualmente, el objetivo universal para estos pacientes es realizar un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT), suponiendo que no sean frágiles y puedan soportar los rigores del procedimiento. Si un paciente con AML resistente, recidivante y no puede obtener una remisión clínica, y ese paciente tiene un donante compatible con HLA adecuado, un buen estado de desempeño (> 90 % de KPS) y sin blastos circulantes, supervivencia general a largo plazo después del trasplante es 20-30 % (Craddock 2011, Duvall 2010). Sin trasplante, no hay supervivencia significativa a largo plazo.

Los pacientes ancianos con leucemia aguda, que no son elegibles para HSCT alogénico, generalmente tienen pobres resultados y, por lo tanto, siguen siendo un desafío terapéutico importante. Aunque entre el 30 % y el 40 % de los pacientes de edad avanzada con AML lograrán una CR con la inducción estándar, la mediana de supervivencia en esta población se aproxima a los diez meses (Oran 2012). Los peores resultados en esta población se han atribuido a la citogenética de alto riesgo, tasas más altas de leucemia secundaria, mayor resistencia a múltiples fármacos, estado de desempeño disminuido, comorbilidades significativas, así como beneficios poco definidos de la consolidación posterior a la remisión y una alta mortalidad relacionada con el tratamiento (Orán 2012). Por lo tanto, un cambio en la estrategia clínica durante la última década ha sido expandir la elegibilidad para HSCT para tratar de incluir pacientes de edad avanzada (Hegenbart, 2006).

Célula A: Inmunoterapia del TCR de PRAME

Como modalidad terapéutica, la terapia de células T adoptivas ha demostrado ser una herramienta eficaz para controlar la recaída después de un trasplante alogénico (Collins, 1997; Kolb, 1995; Porter, 2005). Las células T derivados de un donante no preparado y transferidas de forma adoptiva en ausencia de supresión inmunitaria pueden ser eficaces, especialmente cuando se combinan con quimioterapia, y recuperan las remisiones clínicas que se pueden mantener. Se ha demostrado que las células T expandidas ex vivo que están restringidas en antígenos HLA y péptidos tumorales particulares tienen beneficios en pequeñas series institucionales, utilizando dianas tales como WT1 o PR1. Recientemente, se ha mostrado que la aparición de células T modificadas con receptor de antígeno quimérico, introducidas en el producto de células T autólogas por vectores de lentivirus, es muy eficaz para atacar antígenos específicos de linaje conocidos en varios estados de enfermedad, con la mayor experiencia actualmente en neoplasias de Células B (Porter, 2011; Grupp, 2013). Estos avances más recientes se han comercializado rápidamente, ya que se han podido asociar con la fabricación estándar y se pueden generalizar a una variedad de pacientes con neoplasias malignas que expresan antígenos comunes. Sin embargo, las terapias para la AML y MDS han sido difíciles de alcanzar, ya que las células CAR-T, si son eficaces, probablemente se asocien con citopenias prolongadas.

Otro antígeno peptídico de interés se deriva del antígeno de melanoma expresado preferencialmente (PRAME), que es un antígeno tumoral expresado sobre células malignas en varios tipos de tumores, que incluyen AML y MDS. PRAME tiene una función en la regulación de la señalización del ácido retinoico, una ruta que se puede interrumpir y se sabe que es crítica en la leucemogénesis.

PRAME es un miembro de la familia de antígenos de cáncer de testículo y se expresa en altos niveles en los tejidos germinales, así como en algunas neoplasias malignas. Inicialmente se identificó en el tejido del melanoma, pero posteriormente se detectó en múltiples tipos de cáncer, que incluyen neoplasias malignas linfoides y mieloides. Ha sido identificado por múltiples grupos en células de leucemia mieloide aguda y se considera un antígeno asociado a leucemia (LAA). PRAME es naturalmente inmunogénico y las células T expandidas ex vivo se pueden dirigir, a través del receptor de células T, al péptido PRAME en el contexto de los elementos restrictivos de HLA, lo que sugiere que este puede ser una diana que se puede aprovechar para la terapia celular adoptiva.

Se ha estudiado la sobreexpresión de PRAME y está presente en aproximadamente el 32 % de los pacientes con AML recién diagnosticados (Goswami, 2014), 35 % en un estudio de van Baren et al. (van Baren, 1998) y 55.4 % en un estudio de Qin et al. (Qin, 2009). La expresión alta se asoció con leucemia t(8;21) y t(15;17) (40.7 %) en un estudio realizado por Ding et al. (Ding, 2012). Qin et al. identificaron un 74.4 % y un 56.6 % de expresión y sobreexpresión en muestras de médula ósea en pacientes con MDS (Qin 2009).

La dirección del determinante antigénico PRAME restringido por HLA puede ser una diana similar para la terapia de células T adoptivas como una terapia celular alternativa para pacientes con AML y MDS resistentes.

Inmunoterapia TCR dirigida a PRAME

Existen riesgos de seguridad asociados con la inmunoterapia de TCR, relacionados con la reactividad tanto en la diana como fuera de la diana contra tejidos normales sanos. Por ejemplo, los TCR de alta afinidad generados para la inmunoterapia podrían presentar un riesgo de toxicidad en diana/fuera de tumor, como se informó en un ensayo clínico de células T TCR específicas para MART-1, lo que requiere tratamiento para algunos pacientes. Por lo tanto, es importante seleccionar un antígeno diana cuya expresión en tejidos cancerosos y normales sea bien conocida. Debido a que el antígeno PRAME se ha identificado con expresión en las células epiteliales del riñón en niveles bajos, se realiza una monitorización cuidadosa de la función renal con estudios de formación de imagen y de laboratorio.

La inclusión de un "interruptor de seguridad" para eliminar las células T modificadas genéticamente en caso de toxicidad incontrolable de células T fuera del tumor/en diana mejoraría la seguridad clínica. La Célula A, una terapia basada en TCR dirigida al antígeno PRAME, está diseñada para incorporar una tecnología de interruptor suicida CaspaCIDE para el tratamiento de la AML. El TCR expresado en el producto de células T de Célula A reconoce y se une a un péptido PRAME unido a HLA-A2 sobre la superficie de una célula cancerosa, lo que da como resultado la apoptosis en la célula tumoral.

El TCR que se ha desarrollado tiene una alta afinidad natural, pero no se ha potenciado más su afinidad. Además, la activación del interruptor de seguridad CaspaCIDE en respuesta a la administración de rimiducid da como resultado la

activación de la cascada iCaspase-9 y la eliminación de las células T de Célula A in vivo. Este interruptor de seguridad permite que el paciente reciba los beneficios de la terapia de células T adoptivas, mientras mitiga los riesgos de salud asociados.

Las células T que expresan el TCR expresado por la Célula A mostraron una alta reactividad contra un panel de estirpes celulares tumorales positivas para PRAME y contra células primarias de AML, y ninguna reactividad contra tipos de células normales, con la excepción de una baja reactividad contra células epiteliales tubulares proximales y reactividad intermedia contra células dendríticas maduras. El gen de las cadenas α y β de TCR se secuenció e insertó, junto con el gen suicida iCasp9, en un vector retroviral que se utiliza para transducir células T del paciente para producir el producto de inmunoterapia de células T de TCR de Célula A.

Se aislaron células T específicas de PRAME de alta afinidad de un paciente con AML después de un trasplante alogénico de células madre (Amir et al CCR 2011). Se encontró que las células T reconocían el péptido derivado de PRAME SLLQHLIGL (SLL) descrito previamente por Kessler et al (Kessler, 2001). El análisis adicional de estos clones de células T específicos de PRAME de alta afinidad mostró una alta reactividad contra un panel de estirpes celulares tumorales positivas para PRAME y contra melanoma metastásico, sarcomas y células primarias de AML, y ninguna reactividad contra tipos de células normales, con la excepción de baja reactividad contra células epiteliales tubulares proximales y reactividad intermedia contra células dendríticas maduras. Se secuenció el gen para las cadenas α y β de TCR del clon HSS1 de células T específico de PRAME (también denominado AAV54) y se insertó junto con el gen suicida iCasp9 en un vector retroviral que se utilizará para transducir células T para producir el producto de inmunoterapia de células T de TCR de Célula A.

Estudios preclínicos in vivo

Si bien los modelos de ratones inmunodeficientes históricamente no han sido útiles para predecir toxicidades asociadas con toxicidades inesperadas en diana/fuera de tumor, el uso de modelos de ratones in vivo con TCR de PRAME de Célula A es útil para demostrar tanto la eficacia de la destrucción de TCR dirigido a PRAME, y la eliminación funcional de las células T de Célula A mediante la activación de rimiducid del interruptor CaspaCIDE. Se realizaron dos estudios in vivo, tanto en el modelo de ratón NSG inmunodeficiente (NOD.CgPrkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ; NSG), utilizando Célula A, células T humanas restringidas a HLA-A2.01 transducidas con un γ -retrovirus que codifica iCasp9 y $\alpha\beta$ TCR PRAME. La construcción de Célula A contiene la misma secuencia de aminoácidos modificada con cisteína que el TCR HSS1 modificado con cisteína, que se diseñó para minimizar el emparejamiento erróneo (Amir, 2011).

Eficacia de Célula A contra tumor que expresa PRAME

Se activaron células T humanas restringidas por HLA-A2.01 de donante normal y se transdujeron con el vector de Célula A derivado de pSFG-iC9.2A.PRAME. Las células T de Célula A y las células T de control no transducidas (NT) se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de V β 1, el segmento de dominio variable de la cadena β del TCR de la Célula A. Se establecieron tumores de mieloma U266 en diez ratones NSG mediante inyección en la vena de la cola de 2×10^6 células tumorales U266-EGFP-luciferasa (U266-luc) por animal. En el día 24 posterior al injerto del tumor, 5 ratones recibieron 1×10^7 células T no transducidas (NT) o 1×10^7 células T transducidas con Célula A mediante inyección i.v. Se realizó formación de imágenes IVIS semanalmente para medir el tamaño del tumor.

La Célula A demostró la eliminación del tumor a niveles de fondo después del tratamiento después de una sola inyección i.v. de la Célula A en menos de dos semanas, mientras que la inyección de células T NT no controló el crecimiento del tumor (Figura 21). Utilizando la radiancia promedio como una medida de la carga tumoral, los tumores en ratones tratados con células T NT tenían ~800 veces más células que los ratones tratados con células T de Célula A. Estos datos indican que la Célula A, a una dosis de 1×10^7 células T administradas mediante inyección i.v. son eficaces contra los tumores de mieloma U266 in vivo.

Respuesta de célula A in vivo a Rimiducid

16 ratones recibieron una inyección i.v. de 1×10^7 células T de Célula A en el día 0 como se describió anteriormente. Cuarenta y ocho horas más tarde, a ocho de los ratones se les inyectó i.p. con rimiducid a 5 mg/kg para evaluar la activación de iCasp9 y la apoptosis de las células T de Célula A; los otros ocho ratones se dejaron sin tratar. El análisis de citometría de flujo de los bazo 24 horas después de la administración de rimiducid demostró que, aunque se detectaron células T humanas no transducidas en cinco animales en cada grupo de ocho, rimiducid había eliminado efectivamente la mayoría de las células T de Célula A transducidas en los animales tratados: El 42 ± 1.1 % de las células T humanas eran V β 1+ en ratones no tratados, en comparación con el 7.3 ± 0.2 % en los animales tratados con rimiducid ($p < 0.0001$) (Figura 22, Fila superior: animales no tratados; fila inferior: ratones tratados con rimiducid). Por lo tanto, el iCasp9 codificado dentro de la Célula A representa un interruptor de seguridad en funcionamiento que puede activarse in vivo para eliminar las células de la Célula A.

El interruptor CaspaCIDE (iCasp9) sigue siendo sensible en las células Célula T A después de 51 días in vivo

Se recolectaron células de bazo y médula ósea de ratones tratados con células T modificadas con NT o Célula A, el día 51 después de la inyección de células T (día 74 después de la implantación del tumor), se contaron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de $\text{V}\beta 1$ en células T $\text{CD}4^+$ y $\text{CD}8^+$. Incluso en animales que exhibían una eliminación eficaz del tumor, las células T de Célula A persistían en el bazo y la médula ósea (Figura 3). Había ~600 veces más células T $\text{CD}8^+$ totales y ~130 veces más células T $\text{CD}8^+ \text{V}\beta 1^+$ en los bazos de los ratones que recibieron células T de Célula A que en los ratones que recibieron células T no transducidas.

Se aisló una fracción de células de bazo y médula ósea de los animales tratados con Célula A como se analizó anteriormente, y se cultivaron durante la noche con o sin rimiducid 10 nM para determinar la sensibilidad del interruptor suicida. El rimiducid redujo significativamente la fracción de células T $\text{V}\beta 1^+$ recuperadas tanto del bazo como de la médula ósea ($p < 0.05$), lo que confirma que las células persistentes de la Célula A retienen un gen suicida iCasp9 funcional (Figura 24).

Conclusiones preclínicas

Después de la inyección en la vena de la cola en ratones NSG, las células T de Célula A se pueden detectar en el bazo tan pronto como 24 horas después, y en mayor número a las 48 horas después de la inyección. Las células T de Célula A muestran una persistencia medible y una eficacia antitumoral contra las células de mieloma U266 cuando se administran i.v. en ratones NSG. Las células T modificadas con Célula A, a una dosis de 1×10^7 células T eliminaron los tumores de mieloma U266 en menos de 2 semanas después de la administración y controlaron el crecimiento del tumor durante más de 50 días. El iCASP9 codificado dentro de la célula A funciona in vivo como un interruptor de seguridad que se puede activar por la administración de rimiducid para eliminar las células de la Célula A al inducir la apoptosis. A pesar de la falta de tumor detectable por bioluminiscencia de luciferasa (medida por IVIS), las células T de Célula A se pudieron recuperar tanto del bazo como de la médula ósea a los 51 días; estas células permanecieron sensibles al tratamiento posterior con rimiducid.

Estos datos sugieren que la Célula A es eficaz contra las células tumorales que expresan el antígeno PRAME/HLA-A2 y que el interruptor iCasp9 es eficaz para eliminar las células T transducidas después del tratamiento con rimiducid.

Evaluación clínica de la seguridad y funcionalidad de Rimiducid

Seguridad de la terapia con células TCR en humanos

En general, una preocupación de seguridad para la terapia con células TCR es el riesgo de toxicidad fuera del tumor en diana como resultado de la activación de las células T en la expresión del antígeno tumoral en tejidos normales. Las toxicidades a corto plazo consisten potencialmente en reacciones agudas a la infusión, anafilaxia y paro cardíaco, toxicidades en diana, tales como síndromes de lisis tumoral y síndromes de liberación de citocinas (CRS).

Rimiducid/fármaco dimerizador AP1903

El AP1903 es miembro de una nueva clase de compuestos permeables a los lípidos denominados fármacos activadores o dimerizadores que actúan al inducir la agrupación de proteínas modificadas por ingeniería dentro de las células. La activación inducible por AP1903 del gen suicida Caspase 9 se logra mediante la expresión de una proteína quimérica (iCasp9), fusionada con un dominio de unión a fármacos derivado de la proteína de unión a FK506 humana (FKBP). Esta proteína quimérica permanece inactiva dentro de las células hasta la administración de AP1903, que entrecruza los dominios FKBP e inicia la señalización de iCasp9. Esta señalización induce la apoptosis de las células modificadas genéticamente. AP1903 está formulado a una concentración de 5 mg/ml en Solutol HS 15 al 25 % (un solubilizante no iónico).

Rimiducid en Voluntarios Humanos

Se realizó un estudio de fase I, simple ciego, controlado con placebo, de dosis intravenosa única ascendente en sujetos adultos sanos para determinar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de rimiducid/(AP1903) (Iulucci, 2001). Veintiocho (28) sujetos se inscribieron en 5 grupos de tratamiento en los que se investigaron cinco niveles de dosis de AP1903 (es decir, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/kg). Dentro de cada grupo, 4 sujetos recibieron AP1903, 1 sujeto recibió placebo y 1 sujeto recibió solución salina normal. La única excepción fue en el grupo de tratamiento de 0.5 mg/kg en el que 3 sujetos recibieron AP1903 y 1 sujeto recibió solución salina normal. Dentro de cada grupo de tratamiento, los volúmenes de dosis de AP1903, placebo y solución salina normal fueron equivalentes en base al peso corporal. Todos los tratamientos se administraron como infusiones intravenosas durante un período de 2 horas. Las valoraciones clínicas incluyeron signos vitales (presión arterial en decúbito supino, frecuencia del pulso en decúbito supino y temperatura corporal oral) que se midieron antes de la dosis y a los 10 min, 20 min, 40 min, 1 h, 1 h, 20 min, 1 h 40 min, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después del inicio de la infusión y de nuevo el Día 7. Se realizó un ECG de reposo de 12 derivaciones antes de la dosis, 3 horas y 24 horas después del inicio de la infusión y el Día 7. La monitorización cardíaca continua ocurrió desde aproximadamente 1 h. antes del inicio de la infusión y continuó hasta 3 horas después del inicio de la infusión. Se mostró que AP1903 para inyección es seguro y bien tolerado en todos los niveles de dosis y demostró un perfil farmacocinético favorable.

Funcionalidad clínica de AP1903 (rimiducid)

- 5 Diez sujetos del ensayo CASPALLO se trataron con linfocitos T que contenían el interruptor suicida iCaspase-9 y cuatro sujetos desarrollaron GVHD aguda que se derogó rápidamente después de la administración de AP1903, con eliminación selectiva de células T alorreactivas mediante apoptosis. AP1903 resultó en la eliminación de ≥ 90 % de las células T que expresan caspasa-9 inducible 30 minutos después del final de una infusión intravenosa de 2 horas. No se informaron eventos adversos en asociación con la infusión de AP1903.
- 10 El ensayo DOTTI es un estudio de seguimiento del ensayo CASPALLO. Posteriormente, tres sujetos desarrollaron GVHD aguda de grado I y II y se trataron con una dosis única del fármaco dimerizador AP1903. Cuatro sujetos están vivos a una mediana de 476 días después del trasplante (rango 278-674 días) y que habían recibido AP1903. No hubo eventos adversos inmediatos o tardíos asociados con AP1903.
- 15 **Diseño del estudio**
- Este es un estudio de fase 1 de un solo brazo, aumento/disminución de dosis, un solo centro US para determinar la seguridad y la eficacia de las células T autólogas modificadas genéticamente con una construcción retroviral que consiste en un receptor de células T a/b que reacciona con el péptido PRAME en contexto del elemento de restricción HLA A2.01.
- 20 El uso del diseño de aumento/disminución está respaldado por la ausencia de una terapia eficaz para los pacientes con AML o MDS recidivante o resistentes, y el reconocimiento de que comenzar con una dosificación subterapéutica probablemente conduciría a una progresión leucémica rápida y la incapacidad de determinar si está presente alguna señal de eficacia. El estudio inscribirá aproximadamente hasta 36 pacientes, lo que permitirá tratar y valorar la eficacia de 24 pacientes. Después de la valoración de elegibilidad, los pacientes que califican para el estudio se inscriben y planean realizar una aféresis de células T. Los esfuerzos de mejores prácticas se utilizan para tratar la leucemia o MDS recidivante y resistente de los pacientes, pero generalmente incluirán un análogo de purina, incorporado dentro de un régimen estándar de rescate de AML o MDS, que también cumplirá debidamente la tarea de linfagotamamiento, antes de la activación del tratamiento de estudio en el momento de la infusión de células T fabricadas.
- 25 La seguridad es monitorizada durante todo el ensayo. En base a las pautas establecidas (FDA) para productos de terapia génica para productos de terapia avanzada que utilizan vectores de integración (por ejemplo, construcciones de retrovirus), todos los pacientes tratados con Célula A se deben monitorizar por toxicidades específicas por un total de hasta 15 años, independientemente de su respuesta al agente de tratamiento. Todos los pacientes son monitorizados en este ensayo durante cinco años, seguidos de valoraciones de seguridad anuales en el protocolo de seguimiento de seguridad a largo plazo por separado. El propósito es valorar el riesgo de eventos adversos agudos y tardíos asociados con la terapia celular, así como monitorizar el RCR (retrovirus competente para la replicación).
- 30 La eficacia del agente de tratamiento se puede evaluar a través del criterio de valoración secundario del control de la enfermedad, que incluye la valoración de las respuestas completas y parciales moleculares, citogenéticas y hematológicas. Una medida de la respuesta clínica es determinar el porcentaje de pacientes que se sometieron a un HSCT para el que de otro modo no habrían sido elegibles.
- 35 **Diseño de dosificación:**
- 45 • Si 1/3 experimenta una DLT en la dosis inicial (cohorte 3); otros tres sujetos se inscriben y tratan en la Cohorte 3. Los 3 pacientes iniciales se inscriben secuencialmente, con un seguimiento de 3 semanas después de cada paciente antes de inscribir pacientes adicionales. Todas las cohortes posteriores se pueden inscribir simultáneamente.
- 50 • Si 0/3 o 1/6 de los sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 3 (dosis inicial), entonces los sujetos subsiguientes se inscriben en la Cohorte 4. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 3; entonces los sujetos subsiguientes se inscriben en la Cohorte 2.
- 55 • Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la cohorte 4, entonces los sujetos subsiguientes se inscriben en la cohorte 5. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 4, entonces la Cohorte 3 se puede declarar la MTD y si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 3, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD.
- 60 • Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 5, entonces la Cohorte 5 se puede declarar la MTD si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 5, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 5, entonces la Cohorte 4 se puede declarar la MTD si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 4, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD.
- Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 2, entonces la Cohorte 2 se puede declarar la MTD; si solo 3 sujetos se han tratado en la Cohorte 2, entonces se inscriben 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 2; los sujetos subsiguientes se inscriben en la Cohorte 1.
- Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 1, entonces la Cohorte 1 se puede declarar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 1; entonces el estudio se detiene y los datos son evaluados por el Equipo de Estudio Clínico, que incluye el patrocinador y los investigadores.

Tabla 2: Nivel de dosis de la célula A en cada cohorte en base al peso corporal real del sujeto

Grupo	Célula A
1	0.3×10^6 (± 20 %) células/kg
2	0.625×10^6 (± 20 %) células/kg
3 (dosis inicial)	1.25×10^6 (± 20 %) células/kg
4	2.5×10^6 (± 20 %) células/kg
5	5×10^6 (± 20 %) células/kg

La seguridad de la dosificación se puede evaluar por el Equipo de Estudio Clínico, que está compuesto por el Patrocinador (Oficial Médico Responsable), el Monitor Médico del Estudio y los Investigadores. El equipo de Estudio Clínico revisará los datos de seguridad emergentes de cada cohorte para determinar si se producirá un aumento o disminución de la dosis. Alternativamente, un nivel de dosis intermedio entre el nivel de dosis no tolerado y el nivel de dosis previamente tolerado se puede explorar y declarar MTD si < 2 de 6 sujetos experimentan una DLT a esa dosis.

Si hay células inadecuadas para cumplir con la dosis diana para un sujeto determinado, se le pueden dar células disponibles al sujeto, pero no se considerará evaluable para la determinación de MTD.

Debido a las comorbilidades frecuentes y los medicamentos concurrentes en la población bajo estudio, la atribución de los AE a un fármaco en particular es un desafío. Por lo tanto, todos los AE que no se puedan determinar claramente como no relacionados con las células T de Célula A se pueden considerar relevantes para determinar las DLT y pueden ser revisados por el equipo de Estudio Clínico.

Antes de la leucoaféresis de células T no movilizadas, se pueden recoger y registrar el hemograma y el diferencial del sujeto. Se puede realizar la monitorización de enfermedades infecciosas según las pautas regulatorias establecidas. El sujeto debe cumplir con los criterios institucionales para CBC y plaquetas antes del inicio de la leucoféresis. La fracción de leucocitos se puede recolectar mediante centrifugación de flujo continuo estandarizada. El sujeto se puede monitorizar durante la aféresis. Se puede procesar un procedimiento de aféresis estándar de hasta aproximadamente 3-4 volúmenes de sangre según los procedimientos estándar institucionales, que incluye las precauciones para pacientes con leucemia. El volumen procesado y la duración de la leucoaféresis se pueden documentar y registrar. Si es menos de 5×10^9 se recolectan células mononucleares, se debe consultar al Monitor Médico.

Proceso de fabricación de células PRAME-TCR (Célula A)

El material de partida para la producción de células A es una colección de PBMC derivadas de pacientes que se envía fresca durante la noche a una instalación de fabricación centralizada de GMP o de la cual las células mononucleares se han seleccionado y criopreservado previamente. La colección ficollada se criopreserva en múltiples alícuotas, que se envían a la planta de fabricación centralizada de GMP. Tras la recepción y después de la verificación de la aceptabilidad del material de partida, se transfiere una alícuota a la sala limpia de fabricación y se descongela rápidamente. Las células se lavan y se colocan en medios de cultivo para que las células T proliferen hasta lograr un número de células diana para la transducción. Las células T expandidas se transducen con la construcción retroviral de Célula A. Las células se formulan con los medios de criopreservación (CryoStor CS10) y se criopreservan. El producto de Célula A final se almacena criopreservado en la fase de vapor de nitrógeno líquido (LN2) hasta que se completa la prueba de liberación. El producto de Célula A se puede enviar en la fase de vapor de LN2 en contenedores criogénicos validados. Se estima que tomará aproximadamente de 2 a 4 semanas fabricar y liberar la Célula A para el tratamiento.

Empaque y Formulación: Las células T de Célula A se criopreservan en 10-15 ml de medio de congelación (Cryosstor, BioLife) y se almacenan congeladas en bolsas de criolmacenamiento en la fase de vapor de nitrógeno líquido.

Envío y almacenamiento: La Célula A criopreservada se puede enviar en la fase de vapor de LN2 a sitios clínicos en un contenedor de envío validado. El laboratorio de procesamiento de células receptor almacenará el producto en fase de vapor de LN2 hasta el momento de la infusión. En ese momento, el producto se puede descongelar a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ según las instrucciones de infusión para el receptor. Según el día del envío, el tiempo de envío puede ser superior a 1 día.

Quimioterapia y linfagotamiento antes de la infusión de células T de Célula A Quimioterapia antes de la infusión de células T de Célula A

Antes del tratamiento con las células T modificadas, los pacientes recibirán quimioterapia puente y simultáneamente linfagotadora con uno de los siguientes regímenes en base a la valoración médica de la biología de su enfermedad y comorbilidades, y para proporcionar un control temporal de la enfermedad.

- FLAG-IIda (fludarabina, citarabina, GCSF, idarrubicina)
- FLAG (fludarabina, citarabina, GCSF)
- cladribina como agente único
- ciclofosfamida de agente único como se muestra a continuación

Linfagotamiento antes de la infusión de células T de Célula A

Si el recuento absoluto de linfocitos del sujeto está por debajo de 1000/ul, entonces no se requiere linfagotamiento antes de la infusión de Célula A. Si el ALC del sujeto está por encima de 1000 células/ul, entonces se puede administrar quimioterapia de linfagotamiento con bendamustina 90 mg/m² o fludaribina 90 mg/m² durante 3 días con ciclofosfamida 750 mg/M² a más tardar 3 días antes de la infusión.

5

Se podrían considerar agentes adicionales de linfagotamiento, tales como la fludarabina, para sujetos posteriores a discreción del investigador.

Infusión de células T de Célula A

10

Las células de Célula A se pueden descongelar en un baño de agua a 37 °C, diluir con 50 ml de Plasmalyte, 35 ml inicialmente, luego 15 ml para "enjuagar" la bolsa, como se indica en el Manual de Procedimientos del Estudio y administrar durante 15 a 30 minutos.

15

Los sujetos pueden ser admitidos en el hospital durante la noche para la administración de la Célula A el día 0. La estadía máxima esperada como paciente hospitalizado es de 1 noche, a menos que ocurran AE inesperados. El sujeto puede recibir tratamiento previo con paracetamol y difenhidramina según los estándares institucionales para productos de células T.

20

La monitorización se puede realizar de acuerdo con los estándares institucionales. Se pueden recolectar muestras de sangre para la monitorización de biomarcadores antes de la infusión y 4 horas después de la infusión. La monitorización de biomarcadores se puede agrupar y evaluar. La monitorización de AE continuará durante un mínimo de 4 horas después de la infusión.

25

Evaluación tumoral y biomarcadores

Evaluación tumoral

30

Muestreo de sangre y médula ósea serial para determinar la respuesta del tumor al tratamiento en base a los Criterios de Respuesta modificados del Grupo de Trabajo Internacional (IWG) en AML (Cheson, 2003) y en MDS (Cheson, 2006).

Las biopsias de médula ósea se pueden completar en los siguientes momentos:

35

- dentro de los 7 días anteriores a la inscripción
- dentro de los 7 días previos a la infusión de células T
- día 4 después de la infusión de células T
- 28 días (+/- 1 día) después de la infusión de células T
- como se indica clínicamente

40

Biomarcadores Se pueden recolectar y criopreservar muestras de sangre en serie para futuros análisis de biomarcadores y citocinas selectivas.

Empaque, marcado y almacenamiento del fármaco dimerizador Rimiducid (AP1903)

45

Empaque y Formulación: El AP1903 para inyección se empaqueta en viales de suero de vidrio transparente tipo 1 de 10 ml o 2 ml. El contenido de cada vial está compuesto por el contenido marcado (40 mg o 10 mg respectivamente) de la sustancia fármaco AP1903 disuelta en una solución estéril, libre de endotoxinas, Solutol HS 15 al 25 %/agua para inyección a una concentración de AP1903 de 5 mg/ml y a pH 5.0 – 7.5. Cada vial está tapado con tapón de suero recubierto con Teflón® y un sello con tapa de fácil apertura.

50

Marcado: El marcado principal del producto (aplicado directamente al vial) del AP1903 para inyección puede contener la siguiente información: nombre del producto, AP1903 para inyección; el número de lote del fabricante; concentración del producto, 5 mg/ml; volumen de solución disponible en el vial; contenido de AP1903 total del vial (40 mg o 10 mg); una declaración, "Para administración IV, no contiene conservantes" y la notación IND, "Precaución: Nuevo fármaco limitado por la ley federal para uso en investigación". El producto se podrá marcar de acuerdo al requerimiento de cada autoridad competente.

55

Almacenamiento: El AP1903 para viales de inyección se debe almacenar a 5 °C ± 3 °C (41 °F ± 5 °F) en un refrigerador calificado de acceso limitado y se puede almacenar sin luz.

60

Preparación para el tratamiento: Para uso, el AP1903 se puede diluir antes de la administración. El AP1903 se administra mediante infusión IV a la dosis diana de 0.4 mg/kg diluida en solución salina normal con un volumen que se administrará durante 2 horas, utilizando una bolsa de solución salina sin DEHP y un equipo de solución. Los detalles se incluyen en el manual de farmacia.

65

Inducción suicida de PRAME-TCR con rimiducid

- Se puede infundir una dosis de 0.4 mg/kg de rimiducida (AP1903). Se requiere paracetamol, bloqueadores H1 y H2 y cualquier otro pretratamiento/profilaxis institucional estándar antes de la infusión de rimiducid, como profilaxis de posibles reacciones anafilactoides a la infusión (potencialmente observadas con productos Kolliphor como Solutol). La infusión de rimiducid se realizará utilizando bolsas de solución salina sin DEHP y los detalles se pueden encontrar en el manual de farmacia de rimiducid. Se pueden recolectar muestras de sangre para la monitorización de biomarcadores antes de la infusión y 4 horas después de la infusión. La monitorización de biomarcadores puede agruparse y evaluarse. La monitorización de AE continuará durante un mínimo de 4 horas después de la infusión. La estadía máxima esperada como paciente hospitalizado es de 1 noche, a menos que ocurran AE inesperados.
- En diana – fuera de tumor
- En el caso de que las células T PRAME-TCR de la Célula A reaccionen con una diana no tumoral, los pacientes deben recibir atención de apoyo y la administración de rimiducid según lo determine el Investigador.
- Otros agentes en investigación
- No se pueden administrar otros agentes o productos biológicos en investigación 3 meses después de la Célula A, a menos que el estado de la enfermedad del paciente empeore o no responda. El sujeto puede proceder a HSCT.
- Evaluación clínica
- Valoración clínica
- Se puede realizar una valoración clínica de los sujetos.
 - El estado renal se puede valorar mediante la evaluación de pruebas secuenciales de creatinina y valoraciones adicionales según se indica clínicamente.
 - Muestreo de sangre y médula ósea serial para determinar la respuesta al tratamiento basado en los Criterios de Respuesta modificados del Grupo de Trabajo Internacional (IWG) en AML (Cheson, 2003) y en MDS (Cheson, 2006).
 - Las biopsias de médula ósea se pueden completar en los siguientes momentos:
 - -dentro de los 7 días anteriores a la inscripción
 - -dentro de los 7 días previos a la infusión de células T
 - -día 4 después de la infusión de células T
 - -28 días (+/- 1 día) después de la infusión de células T
 - -como se indica clínicamente
 - La prueba de enfermedad residual mínima se puede realizar con cada aspirado de médula ósea a partir del día 4 utilizando 2 métodos, ya que los pacientes pueden tener MRD que es detectable por una sola metodología.
 - Pruebas moleculares para anomalías moleculares previamente identificadas (Klco, 2015)
 - Citometría de flujo utilizando citometría de flujo de 8 colores (Grimwade, 2014)
- Ensayos funcionales de células T de Célula A
- La persistencia de células T modificadas genéticamente en sangre periférica, tejidos tumorales y cualquier otra muestra celular disponible se pueden realizar mediante qPCR o ensayo de citometría de flujo según el cronograma de la Tabla 2. Además, antes y después de la infusión de Célula A, las muestras de PBMC pueden analizarse mediante una actividad citotóxica específica de PRAME.
- Enfoque estadístico general
- Se pueden utilizar estadísticas descriptivas para resumir las características demográficas y de valor de referencia. Todas las tablas de resumen de parámetros cuantitativos mostrarán la media, la desviación estándar, la mediana, el rango (mínimo y máximo), así como la cantidad de datos faltantes, cuando corresponda. Todas las tablas de resumen de parámetros cualitativos mostrarán recuentos, porcentajes y la cantidad de datos faltantes, cuando corresponda.
- Algoritmo de aumento de dosis
- En la etapa de MTD, el diseño consiste en 5 cohortes (Cuadro 1). Las cohortes que consisten en 3-6 sujetos por cohorte se pueden tratar con las células T de Célula A siguiendo un esquema de aumento/disminución de 3+3 dosis. El sujeto recibirá una dosis de Célula A el día 0.
- La inscripción comenzará a partir de la cohorte 3. Los sujetos se pueden evaluar para determinar las toxicidades limitantes de dosis (DLT) después de la infusión de Célula A. Las DLT observadas se pueden utilizar para determinar si se deben

inscribir sujetos adicionales con el mismo nivel de dosis, un nivel de dosis más alto o un nivel de dosis más bajo utilizando las reglas que se describen a continuación:

- Si 1/3 experimenta una DLT en la dosis inicial (cohorte 3); otros tres sujetos se pueden inscribir en la Cohorte 3. Los 3 pacientes iniciales se pueden inscribir secuencialmente, con un seguimiento de 3 semanas después de cada paciente antes de inscribir cualesquier pacientes adicionales. Todas las cohortes posteriores se pueden inscribir simultáneamente.
- Si 0/3 o 1/6 de los sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 3 (dosis inicial), entonces los siguientes sujetos se pueden inscribir en la Cohorte 4. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 3; entonces los siguientes sujetos se pueden inscribir en la Cohorte 2.
- Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 4, entonces los siguientes sujetos se pueden inscribir en la Cohorte 5. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 4, entonces la Cohorte 3 se puede declarar la MTD y si solo 3 sujetos se han inscrito en la Cohorte 3, entonces se pueden inscribir 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD.
- Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 5, entonces la Cohorte 5 se puede declarar la MTD si solo 3 sujetos se han inscrito en la Cohorte 5, entonces se pueden inscribir 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 5, entonces la Cohorte 4 se puede declarar la MTD si solo 3 sujetos se han inscrito en la Cohorte 4, entonces se pueden inscribir 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD.
- Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 2, entonces la Cohorte 2 se puede declarar la MTD; si solo se inscribieron 3 sujetos en la Cohorte 2, entonces se pueden inscribir 3 sujetos adicionales para confirmar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 2; los siguientes sujetos se pueden inscribir en la Cohorte 1.
- Si 0/3 o 1/6 sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 1, entonces la Cohorte 1 se puede declarar la MTD. Si $\geq 2/6$ sujetos experimentan una DLT en la Cohorte 1; entonces se puede detener el estudio y los datos son evaluados por el Equipo de Estudio Clínico.

Las DLT se definen de la siguiente manera:

Célula A: Las DLT se pueden basar en nuevos eventos adversos que ocurren en los primeros 28 días de terapia y los eventos adversos deben estar relacionados con el fármaco (es decir, definitivamente, probablemente o posiblemente):

Toxicidad relacionada con CRS $\geq$ grado 3 u otra toxicidad orgánica de grado 3

REFERENCIAS

Amir AL, van der Steen DM, van Loenen MM, Hagedoom RS, de Boer R, Kester MDG, de Ru AH, Lugthart GJ, van Kooten C, Heimstra PS, Jedema I, Griffioen M, van Veelen PA, Falkenburg JHF, Heemskerk MHM. PRAMEspecific Allo-HLA-Restricted T Cells with Potent Antitumor Reactivity Useful for therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer. Clin Cancer Res. 17:5615-5625, 2011.

Andrews RK, Gardiner EE et al. Lymphomania. Blood. 2014 May 15;123(20):3057-8.

Armistead PM, de Lima M et al. Quantifying the survival benefit for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relapsed acute myelogenous leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 2009; 15: 1431-38.

Breems DA et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. J Clin Oncol. 2008; 26(29):4791-7.

Chen Y, Cortes J, Estrov Z, et al. Persistence of cytogenetic abnormalities at complete remission after induction in patients with acute myeloid leukemia: prognostic significance and the potential role of allogeneic stem-cell transplantation. J Clin Oncol. 2011; 29:2507.

Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2003; 21:4642.

Cheson BD. Overview of the revised response criteria for acute myelogenous leukemia. Clin Adv Hematol Oncol. 2004;2(5):277-9.

Cheson BD, Greenberg PL et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood. 2006 Jul 15;108(2):419-25.

Collins RH Jr, Shpilberg O et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. J Clin Oncol. 1997 Feb;15(2):433-44.

Craddock C, Labopin M, et al. Factors predicting outcome after unrelated donor stem cell transplantation in primary refractory acute myeloid leukaemia. Leukemia. 2011; 25:808-813.

- de Greef GE, van Putten WL, Boogaerts M, et al. Criteria for defining a complete remission in acute myeloid leukaemia revisited. An analysis of patients treated in HOVON-SAKK cooperative group studies. *Br J Haematol*. 2005; 128:184.
- 5 Ding K, Wang XM et al. PRAME Gene Expression in Acute Leukemia and Its Clinical Significance. *Cancer Biol Med*. 2012 Mar;9(1):73-6.
- Craddock C, Labopin M, et al. Factors predicting outcome after unrelated donor stem cell transplantation in primary refractory acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2011; 25:808-813. Duval M, Klein JP et al. Hematopoietic stemcell transplantation for acute leukemia in relapse o primary induction failure. *J Clin Oncol*. 2010; 28:3730-38.
- 10 Epping, MT, Wang, L et al. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*. 2005;122: 835-847.
- 15 Giles F et al. Outcome of patients with acute myelogenous leukemia after second salvage therapy. *Cancer*. 2005;104(3):547-54.
- Goswami M, Hensel N et al. Expression of putative targets of immunotherapy in acute myeloid leukemia and healthy tissues. *Leukemia*. 2014 May;28(5):1167-70.
- 20 Grimwade D, Freeman SD et al. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood*. 2014 Nov 27;124(23):3345-55.
- Grupp SA, Kalos M et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Apr 18;368(16):1509-18.
- 25 Hegenbart U, Niederwieser et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation- based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 20;24(3):444-53.
- 30 Ikeda, H, Lethe, B et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 1997; 6:199-208.
- Iulucci JD, Oliver SD et al. Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2001 Aug;41(8):870-9.
- 35 Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, Verdijk P, van Veelen PA, Kloosterman-Joosten AM, et al. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med*. 2001;193:73-88.
- 40 Kico JM, Miller CA et al. Association Between Mutation Clearance After Induction Therapy and Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA*. 2015 Aug 25;314(8):811-22.
- Kolb HJ, Schattenberg A et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995 Sep 1;86(5):2041-50.
- 45 Kumar CC. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *Genes Cancer*. 2011 Feb;2(2):95-107.
- Löwenberg B, Ossenkoppele GJ et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2009;361(13):1235-48.
- 50 Mangan J and Luger S. Salvage therapy for relapsed o refractory acute myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2011; Apr; 2(2): 73-82.
- 55 Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, et al. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. *J Clin Oncol*. 2004; 22:2410.
- Medeiros BC, Othus M et al. Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2224-28.
- 60 Oran B and Weisdorf DJ. Survival for older patients with acute myeloid leukemia: a population-based study. *Haematologica*. 2012 Dec; 97(12): 1916-24.
- 65 Porter DL, June CH et al. T-cell reconstitution and expansion after hematopoietic stem cell transplantation: 'T' it up! *Bone Marrow Transplant*. 2005 May;35(10):935-42.

Porter DL, Levine BL et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Aug 25;365(8):725-33.

- 5 Qin Y, Zhu H et al. Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease. *Leuk Res*. 2009 Mar;33(3):384-90.

Sekeres M and Cutler C. How we treat higher-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014;123(6): 829-36.

- 10 van Baren N, Chambost H et al. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Brit. J. Haemat*. 1998;102: 1376-79.

La remisión completa en la AML se definió utilizando los siguientes criterios desarrollados por un Grupo de Trabajo Internacional (Dohner et al, 2010; Cheson et al, 2001; de Greef et al, 2005):

- 15
- Valores normales de recuento absoluto de neutrófilos ($>1000/\text{microl}$) y recuento de plaquetas ($>100,000/\text{microl}$) e independencia de la transfusión de glóbulos rojos.
 - Una biopsia de médula ósea que no revela grupos o colecciones de células de blastos. Debe estar ausente la leucemia extramedular (por ejemplo, afectación del sistema nervioso central o de tejidos blandos).
 - 20 • Una aspiración de médula ósea revela una maduración normal de todos los componentes celulares (es decir, serie eritrocítica, granulocítica y megacariocítica). No hay ningún requisito para la celularidad de la médula ósea.
 - Menos del 5 por ciento de células de blastos están presentes en la médula ósea y ninguno puede tener un fenotipo leucémico (por ejemplo, bastones de Auer). La persistencia de la displasia es preocupante como indicador de AML residual, pero no se ha validado como criterio para el estado de remisión.
 - 25 • La ausencia de una anomalía citogenética clonal previamente detectada (es decir, remisión citogenética completa, CRc) confirma el diagnóstico morfológico de CR, pero actualmente no es un criterio requerido. Sin embargo, la conversión de un cariotipo anormal a uno normal en el momento de la primera CR es un indicador de pronóstico importante, lo que respalda el uso de CRc como criterio para CR en AML (Cheson, 2003; Marcucci et al, 2004; Chen et al, 2011).
 - CR con recuperación plaquetaria incompleta (CRp): Todos los criterios de CR excepto trombocitopenia residual
 - 30 (recuento de plaquetas $<100 \times 10^9/\text{L}$ [$100,000/\mu\text{L}$])
 - CR con recuperación incompleta (CRI): Todos los criterios de CR excepto neutropenia residual (recuento absoluto de neutrófilos $<1.0 \times 10^9/\text{L}$ [$1000/\mu\text{L}$])

Polipéptidos de caspasa-9 modificados con actividad basal más baja y pérdida mínima del ligando IC50

- 35
- La señalización basal, la señalización en ausencia de un agonista o un agente activador, prevalece en una multitud de biomoléculas. Por ejemplo, se ha observado en más de 60 receptores acoplados a proteína G de tipo silvestre (GPCR) de múltiples subfamilias [1], quinasas, tales como ERK y abl [2], inmunoglobulinas de superficie [3] y proteasas. Se ha planteado la hipótesis de que la señalización basal contribuye a una gran variedad de eventos biológicos, desde el
- 40 mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias, el desarrollo y la diferenciación de las células B [4-6], la diferenciación de las células T [2, 7], el desarrollo de los timocitos [8], la endocitosis y tolerancia a las drogas [9], autoinmunidad [10], al crecimiento y desarrollo de las plantas [11]. Si bien su significado biológico no siempre se comprende por completo o no es evidente, la señalización basal defectuosa puede tener consecuencias graves. La señalización de proteína G_s basal defectuosa ha provocado enfermedades, tales como la retinitis pigmentosa, el
- 45 daltonismo, la diabetes insípida nefrogénica, la resistencia familiar a la ACTH y la hipercalcemia hipocalciúrica familiar [12, 13].

- Aunque la homodimerización del iniciador de tipo silvestre Caspasa-9 es energéticamente desfavorable, lo que los convierte en su mayoría en monómeros en solución [14-16], la actividad basal inherente de bajo nivel de Caspasa-9 sin procesar [15, 17] se potencia en la presencia del "apoptosoma" basado en Apaf-1, su regulador alostérico natural [6]. Más aún, los niveles de expresión suprafisiológicos y/o la colocación podrían conducir a una dimerización impulsada por la proximidad, mejorando aún más la activación basal. Las células modificadas de la presente solicitud pueden comprender ácidos nucleicos que codifican un polipéptido Caspasa-9 quimérico que tiene una actividad de señalización basal más baja. En la siguiente tabla se proporcionan ejemplos de mutantes de Caspasa-9 con señalización basal más baja. Los
- 55 polinucleótidos que comprenden mutantes de Caspasa-9 con señalización basal más baja se pueden expresar en las células modificadas utilizadas para la terapia celular en el presente documento. En estos ejemplos, las células modificadas pueden incluir un interruptor de seguridad, que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de Caspasa-9 quimérico de señalización basal inferior. En el caso de un evento adverso después de la administración de las células modificadas que comprenden las moléculas de estimulación quiméricas o los receptores de antígenos quiméricos del presente documento, la actividad de Caspasa-9 se puede inducir al administrar el dimerizador al paciente, induciendo de esta manera la apoptosis y la eliminación de algunas o todas las células modificadas. En algunos ejemplos, la cantidad de dimerizador administrado se puede determinar como una cantidad diseñada para eliminar la mayor cantidad, al menos el 80 % o el 90 % de las células modificadas. En otros ejemplos, la cantidad de dimerizador administrado se puede determinar como una cantidad diseñada para eliminar solo una porción de las células modificadas, con el fin de aliviar los
- 60 síntomas o afecciones negativas, mientras se deja una cantidad suficiente de células modificadas terapéuticas en el paciente, con el fin de continuar la terapia. Los métodos para utilizar polipéptidos quiméricos Caspasa-9 para inducir la

apoptosis se discuten en la Publicación PCT Número WO 2011/146862 de Malcolm K. Brenner et al., titulada Métodos para inducir la apoptosis selectiva, presentada el 20 de mayo de 2011, y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Número US 2011/0286980 de Malcolm K. Brenner et al., titulada Métodos para inducir la apoptosis selectiva, presentada el 20 de mayo de 2011, emitida el 28 de julio de 2015 como Número de Serie de Patente de EE.UU. 9,089,520.

5 Los polipéptidos de caspasa quimérica que tienen actividad basal modificada se discuten en la Publicación PCT Número WO2014/164348 de David Spencer et al., titulada Polipéptidos de caspasa modificados y usos de los mismos, presentada el 7 de marzo de 2014, publicada el 9 de octubre de 2014 y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Número US2014/0255360 de David Spencer et al., titulada Polipéptidos de caspasa modificados y usos de los mismos, presentada el 7 de marzo de 2014; y en la Publicación de Patente de EE.UU. Número US 2015/0328292 de Spencer et al., presentada el 6 de marzo de 2015. Los métodos para inducir la apoptosis parcial de las células modificadas terapéuticas se discuten en la Publicación PCT Número WO 2014/197638 de Kevin Slawin et al., titulada Métodos para inducir la apoptosis parcial utilizando polipéptidos de caspasa, presentada el 4 de junio de 2014, publicada el 11 de diciembre de 2014 y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Número US 2016/0151465 de Kevin Slawin et al., titulada Métodos para inducir la apoptosis parcial utilizando polipéptidos de caspasa, presentada el 4 de junio de 2014.

10

15

Tabla 3: Clases mutantes de caspasa y actividad basal

Actividad Basal	Dominio de homodimerización	Sitios de escisión e interacción XIAP	Fosforilación	Dobles mutantes, Misc.	Mutantes totales
IC ₅₀ basal y similar disminuida			S144A		80
			S144D		*, predicho
		T317S	S196D		
IC ₅₀ basal disminuida pero mayor	N405Q	D330A	S183A	D330A-N405Q	Negrita, Probado en células T
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰¹ SAQT (Casp-10)	D330E	S195A	D330A-5144A	
	F404Y	D330G	S196A	D330A-S144D	
	F406A	D330N		D330A-S183A	
	F406W	D330S		D330A-S196A	
	F406Y	D330V		N405Q-S144A	
	N405Qco	L329E		N405Q-S144D	
		T317A		N405Q-S196D	
				N405Q-T317S	
				*N405Q-S144Aco	
				*N405Q-T317Sco	
IC ₅₀ basal disminuida pero mucho más alta	F404T	D315A	Y153A		
	F404W	A316G	Y153F		
	N405F	F319W	S307A		
	F406T				
Basal e IC ₅₀ similares	C403A	³¹⁶ ATPF ³¹⁹ AVPI (SMAC/Diablo)			
	C4035	T317C			
	C403T	P318A			
	N405A	F319A			
Basal aumentado	N405T	T317E		D330A-N405T	
		F326K			
		D327G			
		D327K			
		D327R			
		Q328K			
		Q328R			
		L329G			
		L329K			
		A331K			
Catalíticamente muerto	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ AAAAA			C285A	
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ YCSTL (Casp-2)			D315A-D330A	
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ CIVSM (Casp-3)			D330A-Y153A	
	⁴⁰² GCFNF ⁴⁰⁶ QPTFT (Casp-8)			D330A-Y153F	
	G402A			D330A-T317E	
	G402I				
	G402Q				
	G402Y				
	C403P				
	F404A				
	F404S				

	F406L				
--	-------	--	--	--	--

Generación de la construcción del vector retroviral

Se diseñó un TCR humano específico para el péptido derivado de PRAME SLLQLIGL (PRAME) discutido en la presente solicitud utilizando un TCR-AV1S1 y un TCR-BV1 S1 con codones optimizados y modificados con cisteína ligados por la secuencia T2A, luego del aislamiento e identificación de un Clon de células T que reconoce el polipéptido SLLQLIGL (Heemskerk 2001; Heemskerk, 2004; van Loenen, 2011). Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena beta de TCRalfa y TCR se optimizaron por codones y se modificaron con cisteína para evitar la formación de dímeros de TCR mixtos y para optimizar la expresión de TCR.

La construcción retroviral SFG.iCasp9.2A.SLL-TCR (también denominada SFG.iCasp9.2A.PRAME) codifica un ADNc de caspasa-9 humano inducible por ligando sintético (iCasp9) ligado a las cadenas alfa y beta de un TCR humano específico para el péptido derivado de PRAME SLLQLIGL (PRAME 425-433).

Los componentes funcionales importantes para la actividad son:

- 5' LTR - Repetición terminal larga retroviral en el extremo 5' del vector (funciona como secuencia promotora)
- ψ - Señal de encapsidación retroviral (psi; necesaria para el empaque de ARN en partículas de virión)
- SA - sitio del aceptador de empalme
- iCasp9: el casete de expresión de caspasa-9 inducible. iCasp9 consiste en la proteína de unión a FK506 humana (FKBP12) con una mutación F36V, conectada a través de un ligador Gly-Ser de 6 aminoácidos a una caspasa-9 humana modificada con el dominio CARD suprimido
- FKBP12-F36V: una proteína de unión a FK506 diseñada por ingeniería que contiene la mutación F36V para optimizar la afinidad de unión para AP1903. El dominio de la proteína FKBP12-F36V sirve como el dominio de unión a fármacos/oligomerización de las proteínas terapéuticas ligadas. FKBP12-F36V funciona como regulador de caspasa-9: en ausencia de AP1903, iCasp9 tiene una actividad mínima; la unión de AP1903 a FKBP12-F36V promueve la dimerización y pone dos moléculas de caspasa-9 en aposición para iniciar la apoptosis. Por lo tanto, la fracción FKBP12-F36V reemplaza funcionalmente el módulo de dimerización/activación endógeno (Dominio de Activación y Reclutamiento de Caspasa; CARD) de caspasa-9 que media la oligomerización asociada con Apaf-1.
- Ligador - Ligador peptídico sintético Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly utilizado para fusionar secuencias reguladoras de interrupción a caspasa-9.
- Caspasa-9: secuencia de ADNc de caspasa-9 humana (regulador proapoptótico crítico) y componente terapéutico de la construcción (gen suicida regulado). El módulo de dimerización/activación endógeno (Dominio de activación y reclutamiento de caspasa; CARD) se suprimió para reducir la unión espontánea de Apaf1 y, por lo tanto, la destrucción de fondo.
- 2A - codifica un péptido sintético de 20 aminoácidos del virus de insecto Thosea asigna, que funciona como un ligador escindible entre la proteína caspasa-9 y las proteínas TCR.
- TCR: el TCR humano específico para el péptido SLLQLIGL derivado de PRAME. Consiste en una cadena α y β .
- TCR β - Secuencia de la cadena beta del PRAME-TCR, que pertenece a la familia Vbeta1. Consiste en una región variable y una constante, en la que se ha insertado una modificación S57C para aumentar el emparejamiento de cadenas TCR.
- 2A - codifica un péptido sintético de 20 aminoácidos del virus de insecto Thosea asigna, que funciona como un ligador escindible entre la proteína caspasa-9 y las proteínas TCR. La secuencia nativa se ha optimizado por codones para reducir los eventos de recombinación con la primera secuencia 2A.
- Secuencia TCR α - de la cadena beta del PRAME-TCR, que pertenece a la familia Valfa8. Consiste en una región variable y una constante, en la que se ha insertado una modificación T48C para aumentar el emparejamiento de cadenas TCR.
- 3' LTR - Repetición terminal larga retroviral en el extremo 3' del vector (funciona como secuencias de terminador/poliadenilación).

Diagrama vectorial

El mapa de plásmido del vector lanzadera retroviral (SFG.iCasp9.2A.SLL-TCR) utilizado en la fabricación del producto se muestra en la Figura 25. Se ilustran los sitios de restricción únicos y las características del transgen.

Los elementos funcionales de la construcción se definen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Componente	Inicio	Final
LTR	1	590
Casete iCasp9	1880	3091
FKBP12-F36V	1880	2209
Péptido ligador	2210	2227
Casp9	2234	3091

péptido 2A	3092	3145
TCR β	3146	4078
péptido 2A	4079	4132
TCR α	4133	4954
LTR	5158	5707
Marcadores AmpR	7002	7862

Se ensambló una secuencia de vector electrónico de referencia al combinar los archivos de secuencia de ADN para cada componente de la construcción del vector. Dado que el genoma retroviral está basado en ARN, se realizó un análisis de secuencia sobre el ADN plasmídico utilizado para la transfección en la estirpe celular 293VEC (etapa inicial en la preparación del producto retroviral). La secuenciación bidireccional se realizó en el Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG) (Roma, Italia) sobre todo el vector. Los experimentos de secuenciación se ensamblaron utilizando el software SnapGene. No se identificaron bases de emparejamiento erróneo en comparación con la secuencia electrónica de referencia teórica. Se introdujeron TCR β S57C y TCR α -T48C para aumentar el emparejamiento entre las cadenas de TCR α y β . Por lo tanto, estas diferencias no son mutaciones, sino que en realidad fueron diseñadas por ingeniería en la construcción original.

Se produjo una desviación de nucleótidos de la secuencia de referencia dentro del dominio de codificación de Caspasa-9 (nt 2493), que sustituye una glutamina por una arginina. Esto refleja un polimorfismo común de origen natural en al Caspasa-9 humana y estaba presente en el ADNc de Caspasa-9 inicial que actuó como molde para iCaspase-9. Por lo tanto, esto tampoco fue una mutación.

Un vector retroviral SFG.iCasp9.2A SLL-TCR se derivó de un SFG.iCasp9.2A.CAR original. SFG.iCasp9.2A.CAR se derivó de la construcción basada en MSCV.IRES.GFP mediante la clonación del inserto de expresión (denominado F-Casp9 y redenido como iCasp9) de la estructura principal de MCSV en la estructura principal retroviral de SFG. La fracción de iCasp9 se movió de la estructura principal de MCSV a la estructura principal de SFG para (i) eliminar el IRES-GFP coexpresado en la construcción de MCSV y (ii) utilizar la estructura principal de SFG. Además, las construcciones retrovirales SFG han demostrado una estabilidad de hasta 9 años. En la estructura principal de SFG, el casete iCasp9 se unió a la secuencia de TCR a través de un ligador escindible similar a 2A. La secuencia similar a 2A codifica un péptido de 20 aminoácidos del virus de insecto Thossea asigna, que media >99 % en la escisión entre una glicina y un residuo de prolina terminal, lo que da como resultado 19 aminoácidos adicionales en el terminal C de iCasp9 y 1 residuo adicional de prolina en el terminal N de la cadena beta de TCR. El elemento TCR consiste en el TCR β humano de longitud completa (regiones variable y constante) y el TCR α humano de longitud completa (regiones variable y constante), ligados por un segundo codón optimizado T2A.

El casete de vector que incluye la secuencia CAR no relacionada se eliminó a través de la digestión enzimática con PSI-1 (presente en la secuencia de iCasp9) y MLU-1 (presente después de la detención del codón de la secuencia CAR no relacionada). SIGMA Aldrich Company sintetizó una construcción, con la secuencia iCasp9 presente después del sitio PSI-1, en marco con el péptido 2A, TCR β , un segundo péptido 2A y TCR α , y se envió al centro OPBG en el vector de expresión PUC. El casete del gen relevante presente en el vector PUC se obtuvo después de la digestión enzimática con PSI-1 y MLU-1 y se utilizó para la ligación en la estructura principal del vector, preparado como se describió anteriormente.

El vector retroviral SFG.iCasp9.2A.SLL-TCR se fabricó en el Laboratorio de Terapia Celular y Génica para Tumores Pediátricos del Ospedale Pediatrico Bambino Gesù. La estirpe celular de empaque para producir el retrovirus se generó en el entorno de investigación utilizando una Campana de Flujo Laminar dedicada y una incubadora de CO₂. El vector retroviral SFG.iCasp9.2A.SLL-TCR se genera a partir de un clon productor de 293VEC RD114 depositado en cGMP.

La estirpe celular de empaque BioVec 293Vec-RD114 es una estirpe celular de empaque basada en HEK293 de riñón embrionario humano. La estirpe celular 293Vec-RD114 se desarrolló utilizando genes de resistencia a la zeocina y la puomicina para expresar de manera estable las proteínas virales de la envoltura (env) gag-pol y RD114 de la leucemia murina de Moloney (MLV). Los vectores producidos por las células 293Vec-RD114 pueden infectar un amplio rango de células de mamíferos.

Para el primer estadio de producción del vector retroviral SFG.iCasp9.2A.SLL-TCR, se utilizó la estirpe celular productora 293VEC GALV para generar un sobrenadante retroviral transitorio, que posteriormente se empleó para transducir de forma estable la estirpe celular productora 293VEC RD114. El Laboratorio de Terapia Celular y Génica para Tumores Pediátricos en OPBG recibió un vial de 293VEC GALV y 293VEC RD114, que posteriormente se expandió y utilizó en el laboratorio de investigación para generar un Banco de Células de Trabajo (WCB), utilizando suero bovino fetal de grado farmacéutico.

Se expandió un vial de la estirpe celular WCB 293VEC GALV en los Laboratorios de Investigación Traslacional utilizando todo el material e instrumentación dedicados. Los 293VEC GALV se transfectaron transitoriamente utilizando el reactivo lipofectamine 2000 y 5 μ g del vector retroviral BPZ-701.

Se aplicaron dos ml del sobrenadante de la transfección a células 293VEC RD114 en presencia de polibreno. Se realizó la clonación de una sola célula y se expandió el clon 293VEC RD114 que produjo el título más alto (utilizando análisis de

PCR para determinar la presencia del vector en el sobrenadante), se almacenó en la instalación de cGMP de OPBG y se utilizó para la producción de retrovirus bajo condiciones de cGMP, después de analizar esterilidad y micoplasma.

5 Las líneas de producción se cultivan en DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco, medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), con un 10 % de suero bovino fetal irradiado con rayos gamma de grado farmacéutico. El sobrenadante de la estirpe de células productoras de 293VEC se filtra a través de filtros de 0.20 µm para eliminar las células 293VEC contaminantes.

10 Las células T primarias se cultivan en un medio definido sin suero ni xeno (Cellgenix). Las PBMC derivadas del paciente se cultivan y activan. Se agrega interleucina 2 recombinante (IL-2; Cellgenix) y las células T se expanden selectivamente. RetroNectin (Takara Bio incorporado, Japón), un péptido quimérico de fragmentos de fibronectina humana, se utiliza para facilitar la transducción retroviral de células T. Las células transducidas se cultivan nuevamente en medios suplementados con IL-2 y se criopreservan en un medio de congelación definido (Cryostor CS10, Biolife Solutions) utilizando un congelador de velocidad controlada.

15 Las células T autólogas son la diana de la modificación genética de la Célula A. Las células mononucleares de sangre periférica se transducirán después de la expansión bajo condiciones específicas de células T. Dado que las células deben proporcionar la señal CD3 para una función TCR adecuada, solo las células T serán funcionales en el producto final.

20 Secuencias de nucleótidos del vector TCR-iCasp9 de PRAME

La siguiente secuencia SEQ ID NO: 85 incluye LTR, ligador, T2A y otras secuencias de codificación de TCR que no son iCasp9 o PRAME. Se entiende que se pueden utilizar variantes y modificaciones de esta secuencia sin afectar la función del vector. Ciertas secuencias de codificación, en orden, son: 5' LTR; FKBP12v; ligador GS; dCaspasa9; T2A; TCR beta; 25 2A; TCRalfa; 3'LTR.

SEQ ID NO: 85: Secuencia de codificación TCR SFG.iC9-2A-SLL.TCR iCasp9-PRAME

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATG
GAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCT
GAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGA
ACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCC
GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGA

30

GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAA
CTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAA
AGAGCCCAACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGTA
CCCGTGTATCCAATAAACCCCTTTCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGG
GAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGT
CCGGGATCGGGAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGG
CCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGC
GTCGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGAACTGACGAGT
TCGGAACACCCGGCCGCAACCCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTCGGGGGCCGTTTTTGT
GGCCCGACCTGAGTCCTAAATCCCAGTCGTTTAGGACTCTTGGTGACCCCCCTTAGA
GGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGA
ATTTTTGCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTGCTGCAGCATCGT
TCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATATGGGCCCGGGCTAG
CCTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTC
ACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGC
CAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGG
TTAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTGGGGTACATCG
TGACCTGGGAAGCCTTGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTA
AGCCTCCGCCTCCTCTTCCTCCATCCGCCCGTCTCTCCCCCTTGAACTCCTCGTTTGA
CCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGC
CATATGAGATCTTATATGGGGCACCCCCGCCCTTGTAAGCTTCCCTGACCCTGACATGAC
AAGAGTTACTAACAGCCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCAC
GAAGTCTGGAGACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAAGTGGACCGACCGGTGGTACC
TCACCCTTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGA
ACCTCGCTGGAAAGGACCTTACACAGTCTCTGCTGACCACCCCCACCGCCCTCAAAGTAGA
CGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGTGGA
CCATCCTCTAGACTGCCATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGAGAC
GGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTACACCGGGATGCTTGA
AGATGGAAAGAAAGTTGATTCCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGC
AAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAGAG
AGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATC
CCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGAATCTGGCGGTGGA
TCCGGAGTCGACGGATTTGGTGATGTGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGAT
TTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACT
TCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTG
CGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAA
GAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCT

GCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCTCCAGGGGCT
GTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGCGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGG
ACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGG
GGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTG
GCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAG
CTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCC
CAGGTTTTGTTTTCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACG
ACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTA
ATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAA
AAAACTTTTCTTTAAACATCAGCTAGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGC
GGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGGCTTCCGGCTGCTGTGCTGCGTGGCCTT
TTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGATAGCGGCTGACCCAGACCCCAAGCACCTGA
TCACCGCCACCGGCCAGAGAGTGACCCTGCGCTGCAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGC
GTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTCGACCAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAAC
GGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACATCCTGGAACGGTTCAGCGCCAGCAGTTCCCCGA
TCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCAGCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCT
GCGCCAGCGCCAGATGGGATAGAGGCGGCGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACT
GACCGTGACCGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTGAGCCCA
GCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTGGTGTGCCTGGCCACCGGCTTC
TACCCCGACCACGTGGAGCTGTCTTGGTGGGTGAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGT
CTGCACCGACCCCCAGCCCCCTGAAAGAGCAGCCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCC
TGAGCAGCAGACTGCGGGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCCGG
TGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAA
GCCTGTGACCCAGATCGTGTCTGCCAAGCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTCACCA
GCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGTCTGAGCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGC
AAGGCCACACTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCTCTGGTGTCTGATGGCCATGGTGAAGCG
GAAGGACAGCAGAGGCGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGA
ATCCCGGCCCTATGCTGCTGCTGCTGGTGCCCGTGTCTGGAAAGTGATCTTCACCCTGGGC
GGCACCAGAGCCCAGAGCGTGACACAGCTGGGCAGCCACGTGTCCGTGTCTGAGAGGG
CCCTGGTGCTGCTGAGATGCAACTACTCTTCTAGCGTGCCCCCTACCTGTTTTGGTACGT
GCAGTACCCCAACCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTGAAGTACACCAGCGCCGCCCACTGG
TGAAGGGCATCAACGGCTTCGAGGCCGAGTTCAAGAAGTCCGAGACAAGCTTCCACCTGA
CCAAGCCCAGCGCCACATGTCTGACGCCGCCGAGTACTTCTGTGCCGTGAGCGGCCAG
ACCGGCGCCAACAACCTGTTCTTCGGCACCGGCACCCGGCTGACAGTGATCCCTTACATC
CAGAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGT
GTGCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACAGCGACG
TGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCG

CCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCA
TCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAG
AAGTCCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGTCCGTGATCGGCTTCAGA
ATCCTGCTGCTGAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGC
TGAACGCGTCATCATCGATCCGGATTAGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATATCAGTGGTCC
AGGCTCTAGTTTTGACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGAT
AAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGG
TTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGAAAAATACATAACTGAGAA
TAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGA
TATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAAT
ATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG
ATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAG
GGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTC
TCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAAACCCCTCAC
TCGGGGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCC
TCTTGACAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGAT
TGAATACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCACACATGCAGCATGTATCAAATTAATTTGGTTTTT
TTTCTTAAGTATTTACATTAAATGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTCCTTGAAATAA
ACATGGAGTATTCAGAATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATCTCCATTGGCTT
TCTACTTTTTCTTTATTTTTTTTTGTCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
TTTGTGTTGTTGGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGAC
TATTAGCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCCT
TCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGATTGATTG
ATGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGACTGTGAAAATGTGTGTATGGGTGTGTG
TGAATGTGTGTATGTATGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGATGTGTGTGTG
GTGACTGTGTCTATGTGTATGACTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTTGTGAAAAAATATTCTATGGTAGTGAGAGCCAACGCTCCGGCTCAGGTGTCA
GGTTGGTTTTTGAGACAGAGTCTTTCACCTTAGCTTGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAA
CGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGCACATCCCCCT
TTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCG
CAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATT
TCACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGC
CCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCC
GCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCA
TCACCGAAACGCGCGATGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTC
ATGATAATAATGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCC
CTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGAT

AAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTT
 ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGT
 AAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCG
 CGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTA
 CGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGCTG
 CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACA
 ACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAC
 CAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACAT
 TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA
 TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
 TAGACAGATCGTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTT
 TACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAG
 ATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTC
 AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT
 GCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGCGGATCAAGAGCTAC
 CAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCT
 AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCT
 CTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG
 GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTG
 CACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCA
 TTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCA
 GGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTAT
 AGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGG
 GGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
 TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
 CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAG
 TGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCG
 ATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC
 GCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGG
 CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCA
 TGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAACCTCAAATATATAAG
 CATTTGACTTGTTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAAGCCAGCTTTTTTTAACATT
 TAAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGATGTTTTTATTTTATAAGGGTTTCAATGTGCAT
 GAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGTATAAATAAAATAGATAAACGTGGAAATT
 ACTTAGAGTTTCTGTCAATTAACGTTTCCTTCCTCAGTTGACAACATAAATGCGCTGCTGAGC
 AAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGATCAATTTCCATTATGCCAGTCATATTAATTACTAGTCA
 ATTAGTTGATTTTTATTTTTGACATATACATGTGAA

GTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCT
 TACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTTCTGCC
 GTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGT
 CGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATG
 GTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGT
 GGTCACTTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGG
 CACAGATGGATGCCCTGTGTGGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTG
 CCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGA
 AAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACC
 CCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCC
 ATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGT
 TTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGA
 GCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTC
 GGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGAAAAAACTTTTTCT
 TAAAACATCAGCTAGCAGAGCC

SEQ ID NO: 87: Secuencia de nucleótidos que codifica TCR beta en la SEQ ID NO: 85 anterior

ATGGGCTTCCGGCTGCTGTGCTGCGTGCCCTTTTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGA
 TAGCGGCGTGACCCAGACCCCAAGCACCTGATCACCGCCACCGGCCAGAGAGTGACCC
 TGCCTGTCAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGCGTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTCGAC
 CAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAACGGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACAT
 CCTGGAACGGTTCAGCGCCAGCAGTTCCTCGATCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCA
 GCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCTGCGCCAGCGCCAGATGGGATAGAGGC
 GGCGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACTGACCGTGACCGAGGACCTGAAGAACGT
 GTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTGAGCCCAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGA
 AAGCCACCCTGGTGTGCCTGGCCACCGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGTCTTGG
 TGGGTGAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGA
 GCAGCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCAGCAGACTGCGGGTGTCCGCCA
 CTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCCGGTGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGC
 GAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCTGTGACCCAGATCGTGTCTGCCGA
 AGCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTG
 AGCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGCTGGT
 GTCCGCTCTGGTGTGATGGCCATGGTGAAGCGGAAGGACAGCAGAGGC

SEQ ID NO: 88: Secuencia de nucleótidos que codifica TCR alfa en la SEQ ID NO: 85 anterior

ATGCTGCTGCTGCTGGTGCCCGTGCTGGAAGTGATCTTCACCCTGGGCGGCACCAGAGC
 CCAGAGCGTGACACAGCTGGGCAGCCACGTGTCCGTGTCTGAGAGGGCCCTGGTGCTGC
 TGAGATGCAACTACTCTTCTAGCGTGCCCCCTACCTGTTTTGGTACGTGCAGTACCCCAA
 CCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTGAAGTACACCAGCGCCGCCACACTGGTGAAGGGCATCA
 ACGGCTTCGAGGCCGAGTTCAAGAAGTCCGAGACAAGCTTCCACCTGACCAAGCCCAGC
 GCCCACATGTCTGACGCCGCCGAGTACTTCTGTGCCGTGAGCGGCCAGACCGGCGCCAA
 CAACCTGTTCTTCGGCACCAGGCCACCCGGCTGACAGTGATCCCTTACATCCAGAACCCCGA
 CCCCGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCA
 CCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACC
 GATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTG
 GTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGA
 CACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAGAAGTCCTTCGA
 GACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGTCCGTGATCGGCTTCAGAATCCTGCTGCT
 GAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGC

Referencias bibliográficas citadas o que proporcionan apoyo adicional al presente ejemplo

5

1. Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert, Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2002. 366(5): p. 381-416.
2. Roose, J.P., et al., T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biol*, 2003. 1(2): p. E53.
3. Tze, L.E., et al., Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol*, 2005. 3(3): p. e82.
4. Schram, B.R., et al., B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. *J Immunol*, 2008. 180(7): p. 4728-41.
5. Randall, K.L., et al., Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nat Immunol*, 2009. 10(12): p. 1283-91.
6. Kouskoff, V., et al., B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(13): p. 7435-9.
7. Hong, T., et al., A simple theoretical framework for understanding heterogeneous differentiation of CD4+ T cells. *BMC Syst Biol*, 2012. 6: p. 66.
8. Rudd, M.L., A. Tua-Smith, and D.B. Straus, Lck SH3 domain function is required for T-cell receptor signals regulating thymocyte development. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(21): p. 7892-900.
9. Sorkin, A. and M. von Zastrow, Endocytosis and signaling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(9): p. 609-22.
10. Luning Prak, E.T., M. Monestier, and R.A. Eisenberg, B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 2011. 1217: p. 96-121.
11. Boss, W.F., et al., Basal signaling regulates plant growth and development. *Plant Physiol*, 2010. 154(2): p. 439-43.
12. Tao, Y.X., Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther*, 2008. 120(2): p. 129-48.
13. Spiegel, A.M., Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol*, 1996. 58: p. 143-70.
14. Shiozaki, E.N., et al., Mechanism of XIAP-mediated inhibition of Caspase-9. *Mol Cell*, 2003. 11(2): p. 519-27.
15. Renatus, M., et al., Dimer formation drives the activation of the cell death protease Caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14250-5.
16. Shi, Y., Mechanisms of Caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002. 9(3): p. 459-70.
17. Shiozaki, E.N., J. Chai, and Y. Shi, Oligomerization and activation of Caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): p. 4197-202.
18. Straathof, K.C., et al., An inducible Caspase-9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4247-54.
19. MacCorkle, R.A., K.W. Freeman, and D.M. Spencer, Synthetic activation of Caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(7): p. 3655-60.
20. Di Stasi, A., et al., Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 2011. 365(18): p. 1673-83.
21. Chang, W.C., et al., Modifying ligand-induced and constitutive signaling of the human 5-HT4 receptor. *PLoS One*, 2007. 2(12): p. e1317.
22. Bloom, J.D. and F.H. Arnold, In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106 Suppl 1: p. 9995-10000.
23. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, Mechanisms of Caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(6): p. 725-31.

24. Boatright, K.M., et al., A unified model for apical Caspase activation. *Mol Cell*, 2003. 11(2): p. 529-41.
25. Chao, Y., et al., Engineering a dimeric Caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for Caspase activation. *PLoS Biol*, 2005. 3(6): p. e183.
26. Stennicke, H.R., et al., Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*, 1999. 274(13): p. 8359-62.
27. Brady, S.C., L.A. Allan, and P.R. Clarke, Regulation of Caspase-9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(23): p. 10543-55.
28. Martin, M.C., et al., Protein kinase A regulates Caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem*, 2005. 280(15): p. 15449-55.
29. Cardone, M.H., et al., Regulation of cell death protease Caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998. 282(5392): p. 1318-21.
30. Raina, D., et al., c-Abl tyrosine kinase regulates Caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2005. 280(12): p. 11147-51.
31. Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. and Wright, D. A. , Site-directed mutagenesis in one day with >80 % efficiency. *Strategies*, 1996. 9(3): p. 3-4.
32. Spencer, D.M., et al., Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol*, 1996. 6(7): p. 839-47.
33. Hsiao, E.C., et al., Constitutive Gs activation using a single-construct tetracycline-inducible expression system in embryonic stem cells and mice. *Stem Cell Res Ther*, 2011. 2(2): p. 11.
34. Waldner, C., et al., Double conditional human embryonic kidney cell line based on FLP and PhiC31 mediated transgene integration. *BMC Res Notes*, 2011. 4: p. 420.

Ejemplos

- Los ejemplos expuestos a continuación ilustran ciertas realizaciones y no limitan la tecnología.

Ejemplo 1: Células T específicas de PRAME

Aislamiento y análisis de células T específicas de PRAME

Todos los estudios se realizaron con la aprobación de la junta de revisión institucional del Centro Médico de la Universidad de Leiden (LUMC). Después del consentimiento informado, se recolectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un paciente que padecía AML que experimentó GVHD aguda después de un solo SCT con HLA-A2 con emparejamiento erróneo y DLI subsiguiente. Sobre la base de un entrecruzamiento, el paciente era HLA-A*0201 positivo y el hermano donante era HLA-A*0201 negativo, mientras que todas las demás moléculas HLA de clase I y II coincidían por completo. Las PBMC de pacientes recolectadas durante la GVHD se tiñeron con anti-HLA-A2-FITC (Pharmingen), anti-HLA-DR-APC (Pharmingen) y anti-CD8-PE (BD) durante 30 min a 4 °C y se activaron (HLA -DRpos), las células T CD8+ derivadas del donante (HLA-A2neg) se aislaron mediante clasificación celular (FACSaria). Dado que las PBMC eran limitadas, las células T clasificadas primero se expandieron con anti-CD3/CD28 y se irradiaron PBMC autólogas (0.5 x 10⁶/ml) en medio de células T. El medio de células T consiste en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Lonza) con suero humano al 10 % (HS), IL-2 (120 UI/ml; Proleukin) e IL-15 (20 ng/ml; Peprotech). Las células T se estimularon de forma no específica utilizando PBMC alogénicas irradiadas (0.5 x 10⁶ /ml), IL-2 (120 UI/ml) y fitohemaglutinina (PHA, 0.8 µg/ml; Murex Biotec Limited). Después de 14 días de cultivo, las células T se marcaron con anti-CD8-APC (BD) y tetrámeros HLA-A2 conjugados con PE específicos para los diferentes péptidos TAA (1-4): para PRAME se probaron: VLDGLDVLL (VLD), SLVSFPEPEA (SLY), ALYVDSLFFL (ALY) y SLLQHLIGL (SLL), para WT-1: RMFPNAPYL, para Pr-1: VLQELNVTV. Para la clasificación de células individuales, las células T se tiñeron con tetrámeros conjugados de APC en combinación con la tinción del kit de repertorio TCR VB (Beckman Coulter) durante 1 h a 4 °C, y las células T CD8+ del tetrámero de SLL *VB1+ y tetrámero de SLL *VB3+ se clasificaron y estimularon de forma no específica utilizando PBMC alogénicas irradiadas (0.5 x 10⁶ /ml), IL-2 (120 UI/ml) y fitohemaglutinina (PHA, 0.8 µg/ml; Murex Biotec Limited). Se aislaron clones de células T específicos de PRAME autorrestringidos de un paciente HLA-A*0201 que fue trasplantado con un injerto de donante totalmente HLA idéntico. Las PBMC derivadas del paciente después de SCT se marcaron con tetrámero de SLL conjugado con PE durante 1 h a 4 °C. Las células T positivas para tetrámero se aislaron mediante MACS utilizando perlas magnéticas recubiertas con anti-PE (Milenyi Biotec) y se expandieron durante 10 días con perlas anti-CD3/CD28 como se proporcionó anteriormente. Para la clasificación posterior, las células T se tiñeron con tetrámero de SLL conjugado con PE y APC anti-CD8 durante 1 h a 4 °C, y las células T CD8+ positivas para tetrámero se clasificaron de forma individual por pocillo y se expandieron. Se seleccionaron tres clones de células T positivas para tetrámero PRAME-SLL AAV54 (también denominado clon 54 o HSS1), AAV46 (también denominado HSS3) y DMG16, y se utilizaron para análisis adicionales. Además, se seleccionó el clon DSK3 específico de PRAME y se determinó la especificidad de este clon de células T mediante estudios de elución de péptidos.

Reactividad funcional de los clones de células T específicos de PRAME

Los ensayos de estimulación se realizaron con 5000 células T y 20 000 dianas en placas de 96 pocillos en medio modificado por Dulbecco Iscoves (IMDM), complementado con suero humano al 10 % (HS) y 100 UI/ml de interleucina 2 (IL-2). Se recolectaron y prepararon las diferentes células malignas y no malignas. Se generaron estirpes celulares B transformadas con el virus de Epstein-Barr (EBV) estable (EBV-LCL) utilizando procedimientos estándar y se cultivaron

en IMDM y FBS al 10 %. K562, COS, T2, estirpes celulares de carcinoma de células renales (RCC 1257, RCC 1774, RCC 1851), estirpes celulares de carcinoma de pulmón (A549, NCI-H292), estirpes celulares de melanoma (518A2, FM3, FM6, SK2.3, MI-3046, BML, 1.14), estirpes celulares de carcinoma de cuello uterino (SIHA, HELA, CASKI), estirpes celulares de carcinoma de mama (MCF7, BT549, MDA231) y estirpes celulares de carcinoma de colon (SW480, HCT116, LS411, LS180) se cultivaron en IMDM y FBS al 10 %. K562, COS, H292, A549, SIHA y HELA que no expresan HLA-A2 se transdujeron con un vector retroviral que codifica HLA-A2 como se discutió anteriormente⁵.

Además, las células de melanoma se aislaron recientemente de un paciente positivo para HLA-A2 con melanoma metastásico en los ganglios linfáticos mediante el aislamiento en ficol de células tumorales trituradas y la subsiguiente clasificación FACS de las células negativas CD45, CD3, CD19, CD14, CD56. Para experimentos seleccionados, se transfectaron células COS-A2 con el vector de expresión pcDNA3.1 que codifica PRAME humano de tipo silvestre. Se cultivó sangre periférica de pacientes positivos para HLA-A2 con células de AML primaria (>80 % de blastos) durante 1 día en IMDM y FCS al 10 % y se utilizó como células estimuladoras. Las células de AML primaria se activaron durante 1 día con GM-CSF (100 ng/ml; Novartis), TNFα (10 ng/ml; R&D Systems), IL-1b (10 ng/ml; Immunex) e IL-6 (10 ng/ml)/ml; Cellgenix), PGE-2 (1 µg/ml; Sigma-Aldrich) e IFNγ (500 UI/ml; Immukine, Boehringer Ingelheim). Se generaron estirpes celulares ALL positivas para HLA-A2 como se discutió anteriormente⁶. Las células B se aislaron de las PBMC mediante MACS utilizando perlas magnéticas recubiertas con anti-CD19 (Miltenyi Biotec). Las estirpes celulares ALL y las células B recién aisladas se activaron al cultivar las células durante 48 h a una concentración de 10^6 células/ml en placas de 24 pocillos en presencia de IL-4 (500 U/ml; Schering-Plough), oligodesoxinucleótido CpG (10 µg/ml; Eurogentec) y 1×10^5 /ml de fibroblastos murinos transfectados con el ligando CD40 humano⁷). Las células B activadas in vivo se derivaron de amígdalas inflamadas. Se generaron blastos de células T mediante estimulación de PBMC con PHA e IL-2 (120 UI/ml) durante 7 días.

Los monocitos se aislaron de las PBMC mediante MACS utilizando perlas magnéticas recubiertas con anti-CD14 (Miltenyi Biotec). Los macrófagos (MØ) se generaron al cultivar células CD14⁺ durante 6 días en IMDM y HS al 10 % a una concentración de 0.5×10^6 células/ml en placas de 24 pocillos. Las células de macrófagos proinflamatorios (MØ1) se obtuvieron mediante cultivo en presencia de GM-CSF (5 ng/ml) y las células de macrófagos antiinflamatorios (MØ2) se cultivaron con M-CSF (5 ng/ml, Cetus Corporation). Las CD derivadas de monocitos se generaron al cultivar células CD14⁺ durante 48 h en IMDM y HS al 10 % a una concentración de 0.5×10^6 células/ml en placas de 24 pocillos en presencia de IL-4 (500 U/ml) y GM-CSF (100 ng/ml). Para la maduración de las DC CD14, las células se cultivaron durante otras 48 h en IMDM y HS al 10 % suplementado con GM-CSF (100 ng/ml), TNFα (10 ng/ml), IL-1b (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), PGE-2 (1 µg/ml), y IFNγ (500 UI/ml).

Las células CD34⁺ se aislaron de injertos de células madre de sangre periférica mediante MACS utilizando perlas magnéticas recubiertas con anti-CD34 (Miltenyi Biotec). Las DC CD34 se generaron al cultivar células CD34 durante 4 días en IMDM y HS al 10 % a una concentración de 0.25×10^6 células/ml en placas de 24 pocillos en presencia de GM-CSF (100 ng/ml), SCF (20 ng/ml; proporcionado amablemente por Amgen) y TNFα (2 ng/ml), y posteriormente durante 3 días con IL-4 adicional (500 UI/ml). Para madurar las DC CD34, las células se cultivaron durante otras 48 h en IMDM y HS al 10 % suplementado con GM-CSF (100 ng/ml), SCF (20 ng/ml), TNFα (10 ng/ml) e IL-1b (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), PGE-2 (1 µg/ml) e IFNγ (500 UI/ml). Para el aislamiento de DC mieloides derivadas de sangre (MDC) y DC plasmocitoides (PDC), las PBMC se tiñeron con mAb anti-BDCA1-PE (Biolegend) o anti-BDCA2-PE (Miltenyi Biotec), respectivamente, y las células positivas para BDCA1-PE o BDCA2-PE se aislaron mediante MACS utilizando perlas magnéticas recubiertas con anti-PE. Las células aisladas de MACS se tiñeron con mAb anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19 y anti-CD56 conjugados con FITC (BD) y los MDC y PDC se seleccionaron mediante clasificación celular en base a la positividad de BDCA1 o BDCA2 y las células negativas al marcador de linaje. Para madurar las MDC y PDC, las células se cultivaron durante 24 h en IMDM y HS al 10 % suplementado con poli-IC (Amersham) o CpG (10 µg/ml) e IL-3 (50 ng/ml; proporcionado amablemente por Novartis), respectivamente. Los fibroblastos se cultivaron a partir de biopsias de piel en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Lonza) con 1 g/l de glucosa (BioWhittaker) y FBS al 10 %.

Los queratinocitos se cultivaron a partir de biopsias de piel en medio libre de suero de queratinocitos complementado con 30 µg/ml de extracto de pituitaria bovina y 2 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) (todos los componentes se adquirieron de Invitrogen). Se cultivaron fibroblastos y queratinocitos durante 3 días en presencia o ausencia de IFNγ (200 UI/ml). Las células epiteliales bronquiales primarias (PBEC) se derivaron y cultivaron como se discutió anteriormente⁴.

Las células estromales mesenquimales (MSC) se derivaron de la médula ósea de donantes sanos como se discutió anteriormente⁵ y cultivaron en DMEM y FBS al 10 %. Las células epiteliales de colon se cultivaron en DMEM F12 (Lonza) y FCS al 10 %, y se suplementaron con EGF (10 ng/ml; Promega), hormona T3 (2 nmol/l; Sigma), hidrocortisona (0.4 µg/ml; Farmacia LUMC) e insulina (5 ng/ml; Sigma). Se cultivaron hepatocitos y células epiteliales biliares intrahepáticas (IHBE) (ambas adquiridas de ScienCell) en RPMI (Lonza) y FBS al 10 %. Las células epiteliales tubulares proximales (PTEC) se aislaron y cultivaron como se discutió anteriormente⁶.

Para las titulaciones de péptidos, las células T2 se preincubaron durante 1 h con diferentes concentraciones de péptido y se lavaron. Después de 18 h de estimulación, se recogió el sobrenadante y se midió la producción de IFNγ mediante ELISA estándar. En los ensayos de citotoxicidad, las células T se probaron en diferentes relaciones efector-diana contra 1,000 dianas marcadas con ⁵¹Cr en placas de 96 pocillos en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 h estándar. En estos experimentos se incluyó un clon HSS12 de células T restringidas por HLA-A2 de control específico para el gen USP11.

Elución de péptidos, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) y espectrometría de masas (MS)

5 La elución de péptidos, RP-HPLC y MS se realizaron como se discutió anteriormente⁸. Brevemente, se lisaron 3×10^{10} células B transformadas con virus de Epstein Barr (EBV-LCL) y los complejos de péptido-HLA-A2 se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando anticuerpo monoclonal (mAb) BB7.2 específico de HLA-A2. Posteriormente, los péptidos se eluyeron de las moléculas HLA-A2 y se separaron de los monómeros HLA y la β 2-microglobulina mediante filtración por tamaño. Después de la liofilización, la mezcla de péptidos se sometió a una primera ronda de RP-C18-HPLC
10 utilizando agua/acetonitrilo/TFA y se recolectaron las fracciones. Se cargó una pequeña muestra de cada fracción sobre células T2 y se analizó el reconocimiento por parte de los clones de células T. La fracción reconocida se sometió a una segunda y tercera ronda de fraccionamiento RP-C18-HPLC. En el segundo fraccionamiento se utilizó un gradiente de agua/isopropanol/TFA, y en el tercer fraccionamiento se utilizó un gradiente de agua/metanol/ácido fórmico. Después del
15 tercer fraccionamiento, se determinaron las masas peptídicas presentes en las fracciones reconocidas y en las fracciones adyacentes no reconocidas mediante MS. Los péptidos cuya abundancia se correlacionaba con el patrón de reconocimiento del clon de células T se seleccionaron para espectrometría de masas en tándem y se determinaron sus secuencias.

20 Expresión de PRAME por PCR cuantitativa en tiempo real e inhibición de la expresión de PRAME al silenciar el ARN

La expresión de PRAME se cuantificó mediante PCR en tiempo real (TaqMan). La inhibición de PRAME se realizó utilizando vectores retrovirales que codifican secuencias de ARN de horquilla pequeña (hp) específicas para PRAME en combinación con el gen de resistencia a la puomicina proporcionado amablemente por el Dr. R. Bernards, NKI, Amsterdam, Países Bajos.⁹ Las células transducidas retroviralmente se cultivaron con diferentes concentraciones de puomicina durante al menos 1 semana antes de la prueba. Las células epiteliales tubulares proximales (PTEC) se cultivaron a 3 μ g/ml, la estirpe celular de carcinoma de células renales RCC1257 a 4 μ g/ml y células dendríticas derivadas CD34⁺ (CD34DC) a 0.4 μ g/ml. Las CD34DC se generaron como se proporciona en el presente documento y se transdujeron el día 1 de cultivo.

30 Transferencia del gen TCR

El uso del gen TCRAV y TCRBV del clon AAV54 (también denominado clon 54 o HSS1) se determinó utilizando transcriptasa inversa (RT)-PCR y secuenciación⁵. HSS1 expresó TCRAV1S1 (IMGT: TRAV8-4*04 y TCR-BV1S1 (IMGT: TRBV9*01). Se construyó un vector retroviral con una cadena TCR α y TCR β modificada con cisteína y optimizada por codón ligada por la secuencia T2A en combinación con el receptor del factor de crecimiento nervioso truncado (Δ NGF-R)^{10,11}. Las células T restringidas por HLA-B8 específicas de citomegalovirus (CMV)-IE1 se clasificaron utilizando tetrámeros de CMV-IE1, se estimularon durante 2 días con PHA y PBMC alogénicas irradiadas y se transdujeron con PRAME-TCR o simulación. Las células T transducidas se clasificaron en base a la positividad para Δ NGF-R y se probaron para reactividad funcional.

40 Expresión de PRAME mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT)

La expresión de PRAME se cuantificó mediante RT-PCR (TaqMan). El ARN total se aisló de las células utilizando un mini kit RNeasy (Qiagen) o el kit micro RNAqueous (Ambion). La síntesis de ADNc de la primera hebra se realizó con cebadores oligo dT utilizando transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) o con transcriptasa inversa Transcriptor (Roche). Las muestras se analizaron en un sistema 7900HT RT-PCR de Applied Biosystems. Se utilizaron los siguientes cebadores PRAME, 5' CGTTTGTGGGGTTCCATTC 3' sentido, 5' GCTCCCTGGGCAGCAAC 3' antisentido y para la sonda antisentido 5' CCTGCCAGCTCCACAAGTCTCCGTG 3'. La sonda utilizó VIC como tinte y TAMRA como extintor; ambos
45 cebadores se eligieron sobre un límite intrón/exón. Cada muestra se analizó por duplicado con ADNc de 50 ng de ARN total. El gen de la porfobilinógeno desaminasa (PBGD) se midió como gen de mantenimiento para asegurar una buena calidad del ADNc.

Ensayo de proliferación de células CD34

55 En el ensayo de inhibición de la proliferación de células CD34, las células CD34 se marcaron con éster de succinimidilo de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) como se discutió anteriormente, y se resuspendieron en medio de cultivo de células progenitoras.¹²

Lista de referencia

60 1. Kessler, J.H., N.J. Beekman, S.A. Bres-Vloemans, P. Verdijk, P.A. van Veelen, A.M. Kloosterman-Joosten, D.C. Vissers, G.J. ten Bosch, M.G. Kester, A. Sijts, D.J. Wouter, F. Ossendorp, R. Offringa, and C.J. Melief. 2001. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* 193:73-88.

2. Molldrem, J., S. Dermime, K. Parker, Y.Z. Jiang, D. Mavroudis, N. Hensel, P. Fukushima, and A.J. Barrett. 1996. Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. *Blood* 88:2450-2457.
3. Inoue, K., H. Ogawa, Y. Sonoda, T. Kimura, H. Sakabe, Y. Oka, S. Miyake, H. Tamaki, Y. Oji, T. Yamagami, T. Tatekawa, T. Soma, T. Kishimoto, and H. Sugiyama. 1997. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood* 89:1405-1412.
4. Gao, L., I. Bellantuono, A. Elsassner, S.B. Marley, M.Y. Gordon, J.M. Goldman, and H.J. Stauss. 2000. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 95:2198-2203.
5. Heemskerk, M.H., R.A. de Paus, P.O. EJMPLORvink, F. Koning, A. Mulder, R. Willemze, J.J. van Rood, and J.H. Falkenburg. 2001. Dual HLA class I and class II restricted recognition of alloreactive T lymphocytes mediated by a single T cell receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98:6806-6811.
6. Nijmeijer, B.A., K. Szuhai, H.M. Goselink, M.L. van Schie, B.M. van der, J.D. de, E.W. Marijt, O.G. Ottmann, R. Willemze, and J.H. Falkenburg. 2009. Long-term culture of primary human lymphoblastic leukemia cells in the absence of serum or hematopoietic growth factors. *Exp. Hematol.* 37:376-385.
7. Hoogendoorn, M., J.O. Wolbers, W.M. Smit, M.R. Schaafsma, R.M. Barge, R. Willemze, and J.H. Falkenburg. 2004. Generation of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)-reactive T-cell lines and clones from HLA class I-matched donors using modified B-CLL cells as stimulators: implications for adoptive immunotherapy. *Leukemia* 18:1278-1287.
8. van Bergen, C.A., M.G. Kester, I. Jedema, M.H. Heemskerk, S.A. Luxemburg-Heijs, F.M. Kloosterboer, W.A. Marijt, A.H. de Ru, M.R. Schaafsma, R. Willemze, P.A. van Veelen, and J.H. Falkenburg. 2007. Multiple myeloma-reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon responsive (ADIR) gene. *Blood* 109:4089-4096.
9. Epping, M.T., L. Wang, M.J. Edel, L. Carlee, M. Hernandez, and R. Bernards. 2005. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 122:835-847.
10. van Loenen, M.M., B.R. de, R.S. Hagedoorn, E.H. van Egmond, J.H. Falkenburg, and M.H. Heemskerk. 2011. Optimization of the HA-1-specific T-cell receptor for gene therapy of hematologic malignancies. *Haematologica* 96:477-481.
11. van Loenen, M.M., R. de Boer, A.L. Amir, R.S. Hagedoorn, G.L. Volbeda, R. Willemze, J.J. van Rood, J.H. Falkenburg, and M.H. Heemskerk. 2010. Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107:10972-10977.
12. Jedema, I., N.M. van der Werff, R.M. Barge, R. Willemze, and J.H. Falkenburg. 2004. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 103:2677-2682.

Aislamiento de TCR específicos de PRAME de alta afinidad del repertorio alo-HLA

Las células T del repertorio alo-HLA que son específicas para el antígeno clínicamente relevante, Antígeno Expresado Preferencialmente de Melanoma (PRAME) se aislaron y analizaron esencialmente como se discute en Amir et al. *Clin Cancer Res* 2011. Se analizaron células T específicas de TAA restringidas con alo-HLA en un paciente que había recibido un solo trasplante de células madre con HLA-A2 con emparejamiento erróneo. El paciente HLA-A2⁺ se trató con quimioterapia y radiación, lo que redujo el nivel de células malignas y el sistema hematopoyético normal del paciente. A continuación, el paciente recibió un trasplante de células madre (SCT) con emparejamiento erróneo de HLA (HLA-A2-); después del SCT, el nivel de células malignas del paciente aumentó, al igual que la presencia de un sistema inmunitario normal. Luego, el paciente recibió una infusión de linfocitos de células de donante HLA-A2, que proporcionó una respuesta beneficiosa de injerto contra tumor (GVT), reduciendo el nivel de células malignas, pero que también resultó en enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Las células T CD8⁺ reactiva a tumor activadas se obtuvieron del paciente (Figura 3). Se identificaron cincuenta clones de células T reactivas anti-HLA-A2, todas expresan diferentes receptores de células T (TCR). La especificidad de TCR se analizó mediante el aislamiento de péptidos unidos a HLA, el fraccionamiento por HPLC multidimensional y la espectrometría de masas. Se identificaron células T que eran específicas para PRAME que ejercían una reactividad altamente específica de un solo péptido.

Los clones de células T restringidas a alo-HLA específicas de PRAME identificados fueron muy reactivos contra un panel de estirpes celulares tumorales positivas para PRAME, así como contra células leucémicas primarias y de melanoma metastásico recién aisladas (positivas a PRAME) (Figura 4). Por ejemplo, se determinó que el clon 54 de células T era específico de PRAME (Figura 5). Curiosamente, la comparación de la sensibilidad al antígeno de las células T específicas de PRAME derivadas del repertorio alo-HLA con las células T específicas de PRAME obtenidas de un individuo que expresa HLA-A2 reveló que las células T específicas de PRAME del repertorio alo-HLA requerían una concentración de péptidos 200 veces menor para la activación de células T. Además, sólo las células T restringidas alo-HLA fueron capaces de reconocer estirpes celulares tumorales y células leucémicas (Figura 6). Estos datos sugieren que la tolerancia de las células T puede limitar la afinidad de las células T específicas del tumor que se pueden obtener del repertorio del paciente.

Después de determinar la alta afinidad de las células T específicas de PRAME derivadas del repertorio alo-HLA, se caracterizó la firma de seguridad de las células T específicas de PRAME. Las células T se probaron exhaustivamente contra un gran panel de células no malignas. Este panel de células no malignas constaba de células epiteliales derivadas de diferentes tejidos, por ejemplo, piel, pulmón, colon, tracto biliar, riñón, hígado, así como fibroblastos, células del estroma mesenquimatoso y todos los diferentes linajes hematopoyéticos, incluidas las células madre hematopoyéticas (Figuras 7 y 8). Las células T tenían una baja reactividad contra las células sanas. Ninguno de los tipos de células no malignas se

reconoció con la excepción de la baja reactividad contra las células epiteliales tubulares proximales (PTEC) y la reactividad intermedia contra las células dendríticas maduras (CD34-mDC). La reactividad se correlacionó rigurosamente con la expresión de PRAME según se analizó mediante RT-PCR cuantitativa, así como mediante la transducción de ARNhp específica de PRAME (Figura 9). (Amir et al Clin Can Res 2011). La especificidad de péptido único de los clones de células T específicos de PRAME restringidos por alo-HLA se demostró mediante la regulación a la baja de la expresión de los antígenos reconocidos utilizando ARNhp de silenciamiento (Figura 10).

Clonación de TCR específicos de PRAME

Se secuenciaron los receptores de células T expresados por los clones AAV54 SLL (también denominado allo 54 o HSS1), AAV46 SLL (también denominado HSS3) y DSK3 QLL. Las secuencias de los dos TCR de alta afinidad diferentes específicos para el péptido SLLQHLIGL de PRAME (AAV54 y AAV46) se muestran en las Figuras 17 y 18. Además, un TCR de alta afinidad dirigido contra el epítipo QLLALLPSL de PRAME, esta secuencia de TCR del clon DSK3 se muestra en la Figura 19. Se construyeron vectores retrovirales que codificaban los TCR restringidos por HLA-A2 específicos de PRAME y se utilizaron para transducir células T de sangre periférica. Las células T CD8⁺ transducidas por TCR específicas de PRAME derivadas de sangre periférica tienen patrones de reconocimiento específicos de PRAME.

Caracterización de células que expresan TCR específicas de PRAME

Las células T CD8⁺ transducidas por TCR teñidas con el tetrámero específico de PRAME demostraron un patrón de reconocimiento similar en comparación con los clones de células T originales correspondientes (Figura 11; también Amir et al. Clin Can Res 2011). Se generaron construcciones retrovirales en las que el PRAME-TCR se liga al interruptor suicida iCasp9. La funcionalidad de las células T transducidas con MP71-PRAME-TCR-iCasp9 y MP71-PRAME-TCR-iCasp9-NGFR fue similar a la de las células T transducidas con MP71-PRAME-TCR-CD20 y MP71-PRAME-TCR-NGFR, y después de la incubación durante la noche con AP1903, se anuló la actividad funcional específica de PRAME de las células T, lo que indica la expresión funcional de iCasp9 (Figura 12 y Figura 15).

Figura 12, diferentes vectores retrovirales que codifican PRAME-TCR se transdujeron en células T específicas de virus y la reactividad se mide contra células diana cargadas con diferentes concentraciones del péptido PRAME y contra dos estirpes celulares de melanoma: FM6 positivo para HLA-A2 y PRAME, y MI3046/2 positivo para HLA-A2 pero negativo para PRAME. También se analizó la reactividad de las células T transducidas contra JY, un EBV-LCL que es positivo para HLA-A*0201 y tiene una expresión intermedia para PRAME. Después del tratamiento durante 18 h con 100 nM de AP1903, la reactividad de PRAME se anuló en las células T transducidas con PRAME-TCR en combinación con iCasp9 (parte derecha de la Figura).

Figura 13. Se probó la reactividad de 4 clones de células T específicas de PRAME diferentes dirigida contra estirpes celulares de sarcoma de Ewing. DSK3 es el clon de células T específico de QLL, DMG16 y AAV54 son 2 clones de células T idénticos (secuencia alfa y beta de TCR idénticas), y AAV46 también se dirige contra el epítipo SLL, sin embargo, el clon expresa un TCR diferente. AAV12 se utiliza como un clon de células T de control positivo que reconoce un péptido del gen USP11. El clon HA1k4 es un clon de control negativo. Las estirpes celulares de sarcoma de Ewing se trataron durante 48 h con 300 UI/ml de IFN-alfa o 100 UI/ml de IFN-gamma, se lavaron y se agregaron a los diferentes clones de células T. Después de 18 h de cocultivo, se recogió el sobrenadante y se midió la producción de IFN-gamma de los clones de células T. Los resultados indican que 8 de 12 estirpes celulares de sarcoma de Ewing expresan PRAME. El tratamiento con IFN-alfa e IFN-gamma aumentó la expresión clase I de HLA sobre la superficie celular, lo que condujo a un mejor reconocimiento de las estirpes celulares de Ewing mediante los diferentes clones de células T.

Figura 14. Se analizó la reactividad de 4 clones de células T específicas de PRAME diferentes contra estirpes celulares de neuroblastoma (NB). DSK3 (específico de QLL), DMG16 y AAV54 (específico de SLL, mismo uso de TCR) y AAV46 (SLL). Se utilizó AAV12 como control positivo que reconoce un péptido de USP11. El clon HA1k4 fue un control negativo. Las estirpes celulares de NB se transdujeron con HLA-A2 (+ A2) tratadas durante 48 h con 300 UI/ml de IFN- α o 100 UI/ml de IFN- γ , se lavaron y se agregaron a los diferentes clones de células T. Después de 18 h de cocultivo, se recogió el sobrenadante y se midió la producción de IFN- γ de los clones de células T. Los resultados indican que 5 de las 7 estirpes celulares NB expresan PRAME (para la estirpe celular 1NB (SK-N-F1) se desconoce la expresión de PRAME, debido a la baja expresión de clase I incluso después del tratamiento con IFN- α e IFN- γ). El tratamiento con IFN- α e IFN- γ aumentó la expresión clase I de HLA sobre la superficie celular, lo que condujo a un mejor reconocimiento de las estirpes celulares NB mediante los diferentes clones de células T.

Mediante RT-PCR cuantitativa, se determinó la expresión de PRAME tanto en las estirpes celulares de sarcoma de Ewing como en las estirpes celulares de neuroblastoma, y se correlacionó con el reconocimiento mediante los clones de células T.

Figura 15 Se transdujeron diferentes vectores retrovirales que codifican PRAME-TCR en células T específicas de virus y se midió la reactividad contra células diana (células T2) cargadas con péptido PRAME y dos estirpes celulares de melanoma positivas para PRAME y positivas para HLA-A2: 518.A2 y FM6, y una estirpe celular de melanoma MI3046/2 negativa para PRAME pero positiva para HLA-A2. Después del tratamiento durante 18 h con 100 nM de AP1903, la reactividad de PRAME se anuló en las células T transducidas con PRAME-TCR en combinación con iCasp9.

La Figura 16 proporciona gráficos de barras que muestran el reconocimiento de células de sarcoma de Ewing por clones de células T específicas de PRAME. Las estirpes celulares de sarcoma de Ewing se trataron con o sin IFN- γ /IFN- α durante 48 h. La expresión de HLA con o sin IFN- γ /IFN- α de las estirpes celulares de sarcoma de Ewing se muestra en la parte derecha de la Figura.

Ejemplos de secuencias TCR de PRAME

Las Figuras 17-19 proporcionan ejemplos de secuencias de aminoácidos de TCR de PRAME. En el presente documento se proporcionan secuencias de aminoácidos y nucleótidos de clones TCR de PRAME.

Clon PRAME 54SLL. (TRAV8-4*04, TRBV9*01) en una construcción PRAME/icasp9.

SEQ ID NO: 1 CDR3 α AA
CAVSGQTGANNLFGTGTTTLTVIP
SEQ ID NO: 2 CDR3 α NT

TGTGCTGTGAGTGGCCAACTGGGGCAAACAACCTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTC
ACCGTTATTCCC

SEQ ID NO: 3 CDR3 α NT α^*

TGTGCCGTGAGCGGCCAGACCGGCGCCAACAACCTGTTCTTCGGCACCGGCACCCGGCT
GACAGTGATCCCT

SEQ ID NO: 4 CDR3 β AA
CASARWDRGGEQYFGPGTRLTVT
SEQ ID NO: 5 CDR3 β NT

TGTGCCAGCGCGAGGTGGGACAGGGGAGGCGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGC
TCACGGTCACA

SEQ ID NO: 6 CDR3 β NT α

TGCGCCAGCGCCAGATGGGATAGAGGCGGCGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACT
GACCGTGACC

SEQ ID NO: 7 VJ α AA

MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTLGSHVSVSERALVLLRCNYSSSVPPYLFWYVQYPNQGL
QLLLKYTSAATLVKINGFEAEFKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCVSGQTGANNLFFGTG
TRLTVIP

SEQ ID NO: 8 VJ α NT

ATGCTCCTGCTGCTCGTCCCAGTGCTCGAGGTGATTTTTACCCTGGGAGGAACCAGAGCC
CAGTCGGTGACCCAGCTTGGCAGCCACGTCTCTGTCTCTGAACGAGCCCTGGTTCTGCTG
AGGTGCAACTACTCATCGTCTGTTCCACCATATCTCTTCTGGTATGTGCAATACCCCAACC
AAGGACTCCAGCTTCTCCTGAAGTACACATCAGCGGCCACCCTGGTTAAAGGCATCAACG
GTTTTGAGGCTGAATTTAAGAAGAGTGAAACCTCCTTCCACCTGACGAAACCCTCAGCCCA
TATGAGCGACGCGGCTGAGTACTTCTGTGCTGTGAGTGGCCAACTGGGGCAAACAACCT
CTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTATTCCC

SEQ ID NO: 9 VJ α NT α

ATGCTGCTGCTGCTGGTGCCCGTGCTGGAAGTGATCTTCACCCTGGGCGGCACCAGAGC
 CCAGAGCGTGACACAGCTGGGCAGCCACGTGTCCGTGTCTGAGAGGGCCCTGGTGCTGC
 TGAGATGCAACTACTCTTCTAGCGTGCCCCCTACCTGTTTTGGTACGTGCAGTACCCCAA
 CCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTGAAGTACACCAGCGCCGCCACACTGGTGAAGGGCATCA
 ACGGCTTCGAGGCCGAGTTCAAGAAGTCCGAGACAAGCTTCCACCTGACCAAGCCCAGC
 GCCCACATGTCTGACGCCGCCGAGTACTTCTGTGCCGTGAGCGGCCAGACCGGCGCCAA
 CAACCTGTTCTTCGGCACCGGCACCCGGCTGACAGTGATCCCT

SEQ ID NO: 10 VDJ β AA

MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLVYVYQQSLDQGL
 5 QFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASARWDRGGEQYF

SEQ ID NO: 11 VDJ β NT

ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGGAT
 TCTGGAGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGCAACTGGACAGCGAGTGACGCTG
 AGATGCTCCCCTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACCAACAGAGCCTGGACCAG
 GGCTCCAGTTCCCTCATTCAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTTG
 10 AACGATTCTCCGCACAACAGTTCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAGCTCTCTGGA
 GCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTCTGTGCCAGCGCGAGGTGGGACAGGGGAGGCGAGC
 AGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA

SEQ ID NO: 12 VDJ β NT ∞

ATGGGCTTCGGCTGCTGTGCTGCGTGGCCTTTTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGA
 TAGCGGCGTGACCCAGACCCCAAGCACCTGATCACCGCCACCGGCCAGAGAGTGACCC
 TGCCTGTCAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGCGTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTCGAC
 CAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAACGGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACAT
 CCTGGAACGGTTCAGCGCCAGCAGTTCCTCGATCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCA
 GCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCTGCGCCAGCGCCAGATGGGATAGAGGC
 15 GGCGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCCAGACTGACCGTGACC

SEQ ID NO: 13 VJ α y AA constante

MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTLGSHVSVSERALVLLRCNYSSSVPPYLFWYVQYPNQGL
 QLLLYKTSAAATLVKINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCAVSGQTGANNLFFGTG
 TRLTVPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDF
 KSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRI
 20 LLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 14 VJ α y AA constante (murino)

MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTLGSHVSVSERALVLLRCNYSSSVPPYLFWYVQYPNQGL
 QLLLYKTSAAATLVKINGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCAVSGQTGANNLFFGTG
 TRLTVPIDIQNPEPAVYQLKDPQSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDS
 KSNGAIAWSNQSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLVSMGLRILL
 KVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 15 VJ α y NT constante

ATGCTCCTGCTGCTCGTCCAGTGCTCGAGGTGATTTTTACCCTGGGAGGAACCAGAGCC
CAGTCGGTGACCCAGCTTGGCAGCCACGTCTCTGTCTCTGAACGAGCCCTGGTTCTGCTG
AGGTGCAACTACTCATCGTCTGTTCCACCATATCTCTTCTGGTATGTGCAATACCCCAACC
AAGGACTCCAGCTTCTCCTGAAGTACACATCAGCGGCCACCCTGGTTAAAGGCATCAACG
GTTTTGAGGCTGAATTTAAGAAGAGTGAAACCTCCTTCCACCTGACGAAACCCTCAGCCCA
TATGAGCGACGCGGCTGAGTACTTCTGTGCTGTGAGTGGCCAAACTGGGGCAAACAACCT
CTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTATTCCCTATATCCAGAACCCTGACCCTGCC
GTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTG
ATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAATGCGTG
CTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCT
GACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCA
GCCCAGAAAGTTCTGTGATGTCAAGCTGGTTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCT
AAACTTTCAAACCTGTCAAGTATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTT
AATCTGCTCATGACGCTGCGGTTGTGGTCCAGCTGA

5 SEQ ID NO: 16 VJ a y NT constante co

ATGCTGCTGCTGCTGGTGCCCGTGCTGGAAGTGATCTTCACCCTGGGCGGCACCAGAGC
CCAGAGCGTGACACAGCTGGGCAGCCACGTGTCCGTGTCTGAGAGGGCCCTGGTGCTGC
TGAGATGCAACTACTCTTCTAGCGTGCCCCCTACCTGTTTTGGTACGTGCAGTACCCCAA
CCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTGAAGTACACCAGCGCCGCCACACTGGTGAAGGGCATCA
ACGGCTTCGAGGCCGAGTTCAAGAAGTCCGAGACAAGCTTCCACCTGACCAAGCCCAGC
GCCCACATGTCTGACGCCGCCGAGTACTTCTGTGCCGTGAGCGGCCAGACCGGCGCCAA
CAACCTGTTCTTCGGCACCGGCACCCGGCTGACAGTGATCCCTTACATCCAGAACCCCGA
CCCCGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCA
CCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACC
GATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTG
GTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCCGAGGA
CACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAGAAGTCCTTCA
GACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGTCCGTGATCGGCTTCAGAATCCTGCTGCT
GAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCTGA

SEQ ID NO: 17 Reservada.

10

SEQ ID NO: 18 VJ α y NT constante (murino) co

ATGCTGCTGCTGCTGGTGCCCGTGCTGGAAGTGATCTTCACCCTGGGCGGCACCAGAGC
CCAGAGCGTGACACAGCTGGGCAGCCACGTGTCCGTGTCTGAGAGGGCCCTGGTGCTGC
TGAGATGCAACTACTCTTCTAGCGTGCCCCCTACCTGTTTTGGTACGTGCAGTACCCCAA
CCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTGAAGTACACCAGCGCCGCCACACTGGTGAAGGGCATCA
ACGGCTTCGAGGCCGAGTTCAAGAAGTCCGAGACAAGCTTCCACCTGACCAAGCCCAGC
GCCCACATGTCTGACGCCGCCGAGTACTTCTGTGCCGTGAGCGGCCAGACCGGCGCCAA
CAACCTGTTCTTCGGCACCGGCACCCGGCTGACAGTGATCCCTGACATTCAGAACCCGGA

ACCGGCTGTATACCAGCTGAAGGACCCCCGATCTCAGGATAGTACTCTGTGCCTGTTTAC
CGACTTTGATAGTCAGATCAATGTGCCTAAAACCATGGAATCCGGAACTTTATTACCGAC
AAGTGCCTGCTGGATATGAAAGCCATGGACAGTAAGTCAAACGGCGCCATCGCTTGGAGC
AATCAGACATCCTTCACTTGCCAGGATATCTTCAAGGAGACCAACGCAACATACCCATCCT
CTGACGTGCCCTGTGATGCCACCCTGACAGAGAAGTCTTTCGAAACAGACATGAACCTGA
ATTTTCAGAATCTGAGCGTGATGGGCCTGAGAATCCTGCTGCTGAAGGTCGCTGGGTTTA
ATCTGCTGATGACACTGCGGCTGTGGTCCTCATGA

SEQ ID NO: 19 VJ β y AA constante

MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLVYQYQQSLDQGL
QFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASARWDRGGEQYFGP
GTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGV
CTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV
5 TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVVKRKS

SEQ ID NO: 20 VJ β y AA constante (murino)

MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLVYQYQQSLDQGL
QFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASARWDRGGEQYFGP
GTRLTVTEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGV
CTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPNNHFRQVQFHLSEEDKWPEGSPKPVQNI
10 SAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGVLMLAMVKKNS

SEQ ID NO: 21 VJ β y NT constante

ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGGAT
TCTGGAGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGCAACTGGACAGCGAGTGACGCTG
AGATGCTCCCCTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACCAACAGAGCCTGGACCAG
GGCCTCCAGTTCTCATTAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTTG
AACGATTCTCCGCACAACAGTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAGCTCTCTGGA
GCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTCTGTGCCAGCGCGAGGTGGGACAGGGGAGGCGAGC
AGTACTTCGGGCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCA
CCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACA
CTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAA
TGGAAGGAGGTGCACAGTGGGTCTGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCC
GCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGG
CAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGAC
GAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGG
TAGAGCAGACTGTGGCTTCACTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGTCTGTCTGCCACCAT
CCTCTATGAGATCTTGCTAGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCGT
15 GCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGC

SEQ ID NO: 22 VJ β y NT constante co

ATGGGCTTCCGGCTGCTGTGCTGCGTGGCCTTTTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGA
TAGCGGCGTGACCCAGACCCCCAAGCACCTGATCACCGCCACCGGCCAGAGAGTGACCC
TGCGCTGCAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGCGTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTCGAC
CAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAACGGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACAT
CCTGGAACGGTTCAGCGCCCAGCAGTTCCTCCGATCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCA
GCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCTGCGCCAGCGCCAGATGGGATAGAGGC
GGCGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACTGACCGTGACCGAGGACCTGAAGAACGT
GTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTGAGCCCAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGA
AAGCCACCCTGGTGTGCCTGGCCACCGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGTCTTGG
TGGGTGAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGA
GCAGCCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCAGCAGACTGCGGGTGTCCGCCA
CCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCCGGTGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGC
GAGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCTGTGACCCAGATCGTGTCTGCCGA
AGCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTG
AGCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGCTGGT
GTCCGCTCTGGTGTGATGGCCATGGTGAAGCGGAAGGACAGCAGAGGC

SEQ ID NO: 23 Reservada.

SEQ ID NO: 24 VJ β y NT constante (murino) co

5

ATGGGCTTCCGGCTGCTGTGCTGCGTGGCCTTTTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGA
TAGCGGCGTGACCCAGACCCCCAAGCACCTGATCACCGCCACCGGCCAGAGAGTGACCC
TGCGCTGCAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGCGTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTCGAC
CAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAACGGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACAT
CCTGGAACGGTTCAGCGCCCAGCAGTTCCTCCGATCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCA
GCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCTGCGCCAGCGCCAGATGGGATAGAGGC
GGCGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACTGACCGTGACCGAAGATCTACGTAACGT
GACACCACCCAAAGTCTCACTGTTTGAGCCTAGCAAGGCAGAAATTGCCAACAAGCAGAA
GGCCACCCTGGTGTGCCTGGCAAGAGGGTCTTTCCAGATCACGTGGAGCTGTCCTGGT
GGGTCAACGGCAAAGAAGTGCATTCTGGGGTCTGCACCGACCCCCAGGCTTACAAGGAG
AGTAATTACTCATATTGTCTGTCAAGCCGGCTGAGAGTGTCCGCCACATTCTGGCACAACC
CTAGGAATCATTTCCGCTGCCAGGTCCAGTTTCACGGCCTGAGTGAGGAAGATAAATGGC
CAGAGGGGTACCTAAGCCAGTGACACAGAACATCAGCGCAGAAGCCTGGGGACGAGCA
GACTGTGGCATTACTAGCGCCTCCTATCATCAGGGCGTGCTGAGCGCCACTATCCTGTAC
GAGATTCTGCTGGGAAAGGCCACCCTGTATGCTGTGCTGGTCTCCGGCCTGGTGTGATG
GCCATGGTCAAGAAAAAGAACTCT

10 Clon PRAME 46SLL (TRAV35*02, TRBV28*01).

SEQ ID NO: 25 CDR3 a AA

CAGIPRDNYGQNFVFGPGTRLSVLP

SEQ ID NO: 26 CDR3 a NT

15

TGTGCTGGGATACCCCGGGATAACTATGGTCAGAATTTTGTCTTTGGTCCCGGAACCAGAT
TGTCCTGTGCTGCCC

SEQ ID NO: 27 CDR3 a NT co*

TGCGCCGGCATCCCTCGGGACAACTACGGCCAGAACTTCGTGTTCCGGCCCTGGCACCAG

20

ACTGAGCGTGCTGCCC

SEQ ID NO: 28b CDR3 AA
CASTPWLAGGNEQFFGPGTRLTVL
SEQ ID NO: 29 CDR3 β NT

TGTGCCAGCACCCCGTGGCTAGCGGGAGGCAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACG
5 GCTCACCGTGCTA

SEQ ID NO: 30 CDR3 β NT co

TGTGCCAGCACCCCTTGGCTGGCTGGCGGCAACGAGCAGTTTTTTGGCCCTGGCACCCG
10 GCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO: 31 VJ α AA

MLLEHLLIILWMQLTWVSGQQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWYKQDPGEGPV
LLIALYKAGELTSNGRLTAQFGITRKDSFLNISASIPSDVGIYFCAGIPRDNYGQNFVFGPGRLS
VLP

15 SEQ ID NO: 32 VJ α NT

ATGCTCCTTGAACATTTATTAATAATCTTGTGGATGCAGCTGACATGGGTCACTGGTCAAC
AGCTGAATCAGAGTCTCAATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAACTG
CACTTCTTCAAGCATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGACCCTGGGGAAGGTCCT
GTCCTCTTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTC
AGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAGTGATGT
AGGCATCTACTTCTGTGCTGGGATACCCCGGGATAACTATGGTCAGAATTTGTCTTTGGT
CCCGGAACCAGATTGTCCGTGCTGCCC

SEQ ID NO: 33 VJ α NT co

20 ATGCTGCTGGAACATCTGCTGATCATCCTGTGGATGCAGCTGACCTGGGTGTCCGGCCAG
CAGCTGAATCAGAGCCCCCAGAGCATGTTTCATCCAGGAAGGCGAGGACGTGTCCATGAAC
TGCACCAGCAGCAGCATCTTCAACACCTGGCTGTGGTACAAGCAGGACCCCGGCGAAGG
ACCCGTGCTGCTGATCGCCCTGTATAAGGCCGGCGAGCTGACCAGCAACGGCAGACTGA
CAGCCCAGTTCGGCATTACCCGGAAGGACAGCTTCCTGAACATCAGCGCCAGCATCCCCA
GCGACGTGGGCATCTACTTTTGCGCCGGCATCCCTCGGGACAACCTACGGCCAGAACTTCG
TGTTCCGGCCCTGGCACCAGACTGAGCGTGCTGCCC

SEQ ID NO: 34 VDJ β AA

MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQMDHENMFWYRQDPGLGL
RLIYFSYDVKMKEKGDIEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASTPWLAGGNEQFFG
25 PGRRLTVL

SEQ ID NO: 35 VDJ β NT

30 ATGGGAATCAGGCTCCTCTGTCGTGTGGCCTTTTGTTCCTGGCTGTAGGCCTCGTAGAT
GTGAAAGTAACCCAGAGCTCGAGATATCTAGTCAAAGGACGGGAGAGAAAGTTTTCTG
GAATGTGTCCAGGATATGGACCATGAAAATATGTTCTGGTATCGACAAGACCCAGGTCTGG
GGCTACGGCTGATCTATTTCTCATATGATGTTAAATGAAAGAAAAGGAGATATTCCTGAG
GGGTACAGTGTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGCTTCTCCCTGATTCTGGAGTCGCCAGC
ACCAACCAGACATCTATGTACCTCTGTGCCAGCACCCCGTGGCTAGCGGGAGGCAATGAG
CAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACCGTGCTA

SEQ ID NO: 36 VDJ β NT co

ATGGGCATCCGGCTGCTGTGCAGAGTGGCCTTCTGCTTTCTGGCCGTGGGCCTGGTGGA
CGTGAAAGTGACCCAGAGCAGCAGATACCTCGTGAAGCGGACCGGCGAGAAGGTGTTCC
TGGAATGCGTGCAGGACATGGACCACGAGAATATGTTCTGGTACAGACAGGACCCCGGC
CTGGGCCTGCGGCTGATCTACTTCAGCTACGACGTGAAGATGAAGGAAAAGGGCGACATC
CCCGAGGGCTACAGCGTGTCCAGAGAGAAGAAAGAGCGGTTTCAGCCTGATCCTGGAAAG
CGCCAGCACCAACCAGACCAGCATGTACCTGTGTGCCAGCACCCCTTGGCTGGCTGGCG
GCAACGAGCAGTTTTTTGGCCCTGGCACCCGGCTGACCGTGCTG

5 37 VJ α y AA constante

MLLEHLLIILWMQLTWVSGQQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWYKQDPGEGPV
LLIALYKAGELTSNGRLTAQFGITRKDSFLNISASIPSDVGIFYCAGIPRDNYGQNFVFGPGTRLS
VLPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSN
SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL
KVAGFNLLMTLRLWSS

10 38 VJ α y AA constante (murino)

MLLEHLLIILWMQLTWVSGQQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWYKQDPGEGPV
LLIALYKAGELTSNGRLTAQFGITRKDSFLNISASIPSDVGIFYCAGIPRDNYGQNFVFGPGTRLS
VLPDIQNPEPAVYQLKDPQSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSN
GAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQNLVSMGLRILLKVA
GFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 39 VJ α y NT constante

ATGCTCCTTGAACATTTATTAATAATCTTGTGGATGCAGCTGACATGGGTCAAGTGGTCAAC
AGCTGAATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAAGT
15 CACTTCTTCAAGCATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGACCCCTGGGGAAGGTCCT
GTCCTCTTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTC
AGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAGTGATGT
AGGCATCTACTTCTGTGCTGGGATACCCCGGGATAACTATGGTCAGAATTTTGTCTTTGGT
CCCGGAACCAGATTGTCCGTGCTGCCCTATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAG
CTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAAC
AAATGTGTCAAAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATG
AGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCAT
GTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAG
TTCCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAA
AACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCTCA
TGACGCTGCGGTTGTGGTCCAGCTGA

20 SEQ ID NO: 40 VJ α y NT constante co

ATGCTGCTGGAACATCTGCTGATCATCCTGTGGATGCAGCTGACCTGGGTGTCCGGCCAG
CAGCTGAATCAGAGCCCCCAGAGCATGTTTCATCCAGGAAGGCGAGGACGTGTCCATGAAC
TGCACCAGCAGCAGCATCTTCAACACCTGGCTGTGGTACAAGCAGGACCCCGGCGAAGG
ACCCGTGCTGCTGATCGCCCTGTATAAGGCCGGCGAGCTGACCAGCAACGGCAGACTGA
CAGCCCAGTTCGGCATTACCCGGAAGGACAGCTTCCTGAACATCAGCGCCAGCATCCCCA
GCGACGTGGGCATCTACTTTTGCGCCGGCATCCCTCGGGACAACCTACGGCCAGAACTTCG
TGTTCCGGCCCTGGCACCAGACTGAGCGTGCTGCCCTACATCCAGAACCCCGACCTGCC
GTGTACCAGCTGAGAGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTCCTGTTACCGACTTC
GACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACTCCGACGTGTACATACCGACAAGAC
CGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACA
AGAGCGATTTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTT
CCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACA
CCAACCTGAACCTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGG
CCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 41 Reservada.

SEQ ID NO: 42 VJ α y NT constante (murino) co

5

ATGCTGCTGGAACATCTGCTGATCATCCTGTGGATGCAGCTGACCTGGGTGTCCGGCCAG
CAGCTGAATCAGAGCCCCCAGAGCATGTTTCATCCAGGAAGGCGAGGACGTGTCCATGAAC
TGCACCAGCAGCAGCATCTTCAACACCTGGCTGTGGTACAAGCAGGACCCCGGCGAAGG
ACCCGTGCTGCTGATCGCCCTGTATAAGGCCGGCGAGCTGACCAGCAACGGCAGACTGA
CAGCCCAGTTCGGCATTACCCGGAAGGACAGCTTCCTGAACATCAGCGCCAGCATCCCCA
GCGACGTGGGCATCTACTTTTGCGCCGGCATCCCTCGGGACAACCTACGGCCAGAACTTCG
TGTTCCGGCCCTGGCACCAGACTGAGCGTGCTGCCCGACATTGAGAACCCGGAACCGGT
GTATACCAGCTGAAGGACCCCGATCTCAGGATAGTACTCTGTGCCTGTTACCGACTTTG
ATAGTCAGATCAATGTGCCTAAAACCATGGAATCCGGAACTTTTATTACCGACAAGTGCCT
GCTGGATATGAAAGCCATGGACAGTAAGTCAAACGGCGCCATCGCTTGGAGCAATCAGAC
ATCCTTCACTTGCCAGGATATCTTCAAGGAGACCAACGCAACATACCCATCCTCTGACGTG
CCCTGTGATGCCACCTGACAGAGAAGTCTTTCGAAACAGACATGAACCTGAATTTTCAGA
ATCTGAGCGTGATGGGCCTGAGAATCCTGCTGCTGAAGGTCGCTGGGTTTAATCTGCTGA
TGACACTGCGGCTGTGGTCCTCATGA

10 SEQ ID NO: 43 VJ β y AA constante

MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGL
RLIYFSYDVKMKEKGDPIEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASTPWLAGGNEQFFG
PGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSG
VSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKP
VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSLVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO: 44 VJ β y AA constante (murino)

15

MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGL
RLIYFSYDVKMKEKGDPIEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASTPWLAGGNEQFFG
PGTRLTVLEDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSG
VCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRQVQFHLSEEDKWPEGSPKPVTON
ISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSLVLMAMVKKKNS

SEQ ID NO: 45 VJ β y NT constante

ATGGGAATCAGGCTCCTCTGTCGTGTGGCCTTTTGTTCCTGGCTGTAGGCCTCGTAGAT
GTGAAAGTAACCCAGAGCTCGAGATATCTAGTCAAAAGGACGGGAGAGAAAAGTTTTCTG
GAATGTGTCCAGGATATGGACCATGAAAATATGTTCTGGTATCGACAAGACCCAGGTCTGG
GGCTACGGCTGATCTATTTCTCATATGATGTTAAATGAAAGAAAAAGGAGATATTCCTGAG
GGGTACAGTGTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGCTTCTCCCTGATTCTGGAGTCCGCCAGC
ACCAACCAGACATCTATGTACCTCTGTGCCAGCACCCCGTGGCTAGCGGGAGGCAATGAG
CAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACCGTGCTAGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCA
CCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAAGGCCACA
CTGGTATGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAA
TGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGACGCCCTCAAGGAGCAGCCC
GCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGG
CAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGAC
GAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGG
GTAGAGCAGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCTGTCTGCCACCA
TCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCG
TGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

5

SEQ ID NO: 46 VJ β y NT constante co

ATGGGCATCCGGCTGCTGTGCAGAGTGGCCTTCTGCTTTCTGGCCGTGGGCCTGGTGGA
CGTGAAAGTGACCCAGAGCAGCAGATACCTCGTGAAGCGGACCGGCGAGAAGGTGTTCC
TGGAATGCGTGCAGGACATGGACCACGAGAATATGTTCTGGTACAGACAGGACCCCGGC
CTGGGCCTGCGGCTGATCTACTTCAGCTACGACGTGAAGATGAAGGAAAAGGGCGACATC
CCCGAGGGCTACAGCGTGTCCAGAGAGAAGAAAGAGCGGTTACGCCTGATCCTGGAAAG
CGCCAGCACCAACCAGACCAGCATGTACCTGTGTGCCAGCACCCCTTGGCTGGCTGGCG
GCAACGAGCAGTTTTTTGGCCCTGGCACCCGGCTGACCGTGCTGGAAGATCTGAAGAACG
TGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAG
AAAGCCACCCTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAAGTGTCTTGG
TGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTGTCCACCGATCCCCAGCCTCTGAAAGA
ACAGCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGTCCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCA
CCTTCTGGCAGAACCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCG
AGAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAA
GCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAG
CGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGT
CTGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCTAA

10

SEQ ID NO: 47 Reservada.

SEQ ID NO: 48 VJ β y NT constante (murino) co

ATGGGCATCCGGCTGCTGTGCAGAGTGGCCTTCTGCTTTCTGGCCGTGGGCCTGGTGGA
CGTGAAAGTGACCCAGAGCAGCAGATACCTCGTGAAGCGGACCGGCGAGAAGGTGTTCC
TGGAATGCGTGCAGGACATGGACCACGAGAATATGTTCTGGTACAGACAGGACCCCGGC
CTGGGCCTGCGGCTGATCTACTTCAGCTACGACGTGAAGATGAAGGAAAAGGGCGACATC
CCCGAGGGCTACAGCGTGTCCAGAGAGAAGAAAGAGCGGTTACGCCTGATCCTGGAAAG

CGCCAGCACCAACCAGACCAGCATGTACCTGTGTGCCAGCACCCCTTGGCTGGCTGGCG
GCAACGAGCAGTTTTTTGGCCCTGGCACCCGGCTGACCGTGCTGGAAGATCTACGTAACG
TGACACCACCCAAAGTCTCACTGTTTGAGCCTAGCAAGGCAGAAATTGCCAACAAGCAGA
AGGCCACCCTGGTGTGCCTGGCAAGAGGGTTCTTTCCAGATCACGTGGAGCTGTCCTGGT
GGGTCAACGGCAAAGAAGTGCATTCTGGGGTCTGCACCGACCCCCAGGCTTACAAGGAG
AGTAATTACTCATATTGTCTGTCAAGCCGGCTGAGAGTGTCCGCCACATTCTGGCACAACC
CTAGGAATCATTTCCGCTGCCAGGTCCAGTTTCACGGCCTGAGTGAGGAAGATAAATGGC
CAGAGGGGTACCTAAGCCAGTGACACAGAACATCAGCGCAGAAGCCTGGGGACGAGCA
GACTGTGGCATTACTAGCGCCTCCTATCATCAGGGCGTGCTGAGCGCCACTATCCTGTAC
GAGATTCTGCTGGGAAAGGCCACCCTGTATGCTGTGCTGGTCTCCGGCCTGGTGTGATG
GCCATGGTCAAGAAAAAGAACTCT

Clon PRAME DSK3 QLL (TRAV12-2*01, TRBV9*01).

5 SEQ ID NO: 49 CDR3 α AA
CAVKDNAGNMLTFGGGTRLMVKP
SEQ ID NO: 50 CDR3 α NT

TGTGCCGTGAAGGATAATGCAGGCAACATGCTCACCTTTGGAGGGGAACAAGGTTAATG
GTCAAACCC

10 SEQ ID NO: 51 CDR3 α NT α *

TGCGCCGTGAAGGACAACGCCGGCAACATGCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGAT
GGTCAAGCCC

15 SEQ ID NO: 52 CDR3 β AA
CASSDGGGVYEQYFGPGTRLTVT
SEQ ID NO: 53 CDR3 β NT

TGTGCCAGCAGCGACGGAGGGGGCGTCTACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGC
TCACGGTCACA

20 SEQ ID NO: 54 CDR3 β NT α

TGTGCCAGCTCTGATGGCGGCGGAGTGACGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACT
GACCGTGACC

25 SEQ ID NO: 55 VJ α AA

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQY
SGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVKDNAGNMLTFG
GGTRLMVKP

SEQ ID NO: 56 VJ α NT

30 ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTGTGGCTTCAGTTGAGCTGGGTTTGA
GCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATT
GCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACCGAGGTTCCAGTCCTTCTTCTGGTACAGACAAT
ATTCTGGGAAAAGCCCTGAGTTGATAATGTTTCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGG
AAGGTTTACAGCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCC
CAGCCCAGTGATTACGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAAGGATAATGCAGGCAACATGCTC
ACCTTTGGAGGGGGAACAAGGTTAATGGTCAAACCC

SEQ ID NO: 57 VJ α NT α

ATGATGAAGTCCCTGCGGGTGCTGCTCGTGATCCTGTGGCTGCAGCTGAGCTGGGTGTG
GTCCCAGCAGAAAGAGGTGGAACAGAACAGCGGCCCTCTGAGCGTGCCAGAAGGCGCTA
TCGCCAGCCTGAACTGCACCTACAGCGACAGAGGCAGCCAGAGCTTCTTCTGGTACAGAC
AGTACAGCGGCAAGAGCCCCGAGCTGATCATGTTTCATCTACAGCAACGGCGACAAAGAGG
ACGGCCCGTTACCGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAGTACGTGTCCCTGCTGATCAGA
GACAGCCAGCCCAGCGACAGCGCCACCTATCTGTGCGCCGTGAAGGACAACGCCGGCAA
CATGCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGATGGTCAAGCCC

SEQ ID NO: 58 VDJ β AA

MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLVYVYQQSLDQGL
QFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSDGGGVYEQYFGP
GTRLTVT

SEQ ID NO: 59 VDJ β NT

ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCCAGTGGAT
TCTGGAGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGCAACTGGACAGCGAGTGACGCTG
AGATGCTCCCCTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACCAACAGAGCCTGGACCAG
GGCCTCCAGTTCTCATTAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTTG
AACGATTCTCCGCACAACAGTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAACCTGAGCTCTCTGGA
GCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTTCTGTGCCAGCAGCGACGGAGGGGGCGTCTACGAGC
AGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA

SEQ ID NO: 60 VDJ β NT ∞

ATGGGCTTCAGACTGCTGTGCTGCGTGGCCTTCTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGA
TAGCGGCGTGACACAGACACCCAAGCACCTGATCACCGCCACCGGCCAGCGCGTGACAC
TGAGATGTAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGCGTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTGGAC
CAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAACGGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACAT
CCTGGAACGGTTCAGCGCCCAGCAGTTCCCGATCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCA
GCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCTGTGCCAGCTCTGATGGCGGCGGAGTG
TACGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACTGACCGTGACC

SEQ ID NO: 61 VJ α y AA constante

MMKSLRVLLVILWLQLSWWSQKQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQY
SGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVKNAGNMLTFG
GGTRLMVKPHIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKTVLDMRS
MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVVI
GFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 62 VJ α y AA constante (murino)

MMKSLRVLLVILWLQLSWWSQKQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQY
SGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVKNAGNMLTFG
GGTRLMVKPDIQNPDAVYQLKDPQSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKA
MDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLVSMGLR
ILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO: 63 VJ α y NT constante

ATGATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTGTGGCTTCAGTTGAGCTGGGTTTGA
GCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATT
GCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACCGAGGTTCCCAGTCCTTCTTCTGGTACAGACAAT
ATTCTGGGAAAAGCCCTGAGTTGATAATGTTTCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGG
AAGGTTTACAGCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCC
CAGCCCAGTGATTACAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAAGGATAATGCAGGCAACATGCTC
ACCTTTGGAGGGGGAACAAGGTTAATGGTCAAACCCCATATCCAGAACCCTGACCCTGCC
GTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTG
ATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTG
CTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCT
GACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCA
GCCCAGAAAGTTCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCT
AAACTTTCAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCTGAAAGTGGCCGGGTTT
AATCTGCTCATGACGCTGCGGTTGTGGTCCAGCTGA

SEQ ID NO: 64 VJ α y NT constante co

ATGATGAAGTCCCTGCGGGTGCTGCTCGTGATCCTGTGGCTGCAGCTGAGCTGGGTGTG
GTCCAGCAGAAAGAGGTGGAACAGAACAGCGGCCCTCTGAGCGTGCCAGAAGGCGCTA
TCGCCAGCCTGAACTGCACCTACAGCGACAGAGGCAGCCAGAGCTTCTTCTGGTACAGAC
AGTACAGCGGCAAGAGCCCCGAGCTGATCATGTTTCATCTACAGCAACGGCGACAAAGAGG
ACGGCCCGTTACCGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAGTACGTGTCCCTGCTGATCAGA
GACAGCCAGCCCAGCGACAGCGCCACCTATCTGTGCGCCGTGAAGGACAACGCCGGCAA
CATGCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGATGGTCAAGCCCCACATCCAGAACCCCG
ACCCCGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGCAAGAGCAGCGATAAGAGCGTGTGCCTGTTC
ACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACC
GACAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTG
GTCCAACAAGAGCGATTTGCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGA
CACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGA
GACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCT
GAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTGA

5

SEQ ID NO: 65 Reservada.

SEQ ID NO: 66 VJ α y NT constante (murino) co

ATGATGAAGTCCCTGCGGGTGCTGCTCGTGATCCTGTGGCTGCAGCTGAGCTGGGTGTG
 GTCCCAGCAGAAAGAGGTGGAACAGAACAGCGGCCCTCTGAGCGTGCCAGAAGGCGCTA
 TCGCCAGCCTGAACTGCACCTACAGCGACAGAGGCAGCCAGAGCTTCTTCTGGTACAGAC
 AGTACAGCGGCAAGAGCCCCGAGCTGATCATGTTTCATCTACAGCAACGGCGACAAAGAGG
 ACGGCCGGTTACCGGCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAGTACGTGTCCCTGCTGATCAGA
 GACAGCCAGCCCAGCGACAGCGCCACCTATCTGTGCGCCGTGAAGGACAACGCCGGCAA
 CATGCTGACCTTCGGCGGAGGACCCCGGCTGATGGTCAAGCCCGACATTCAGAACCCGG
 AACCGGCTGTATACCAGCTGAAGGACCCCGATCTCAGGATAGTACTCTGTGCCTGTTCA
 CCGACTTTGATAGTCAGATCAATGTGCCTAAAACCATGGAATCCGGAACCTTTATTACCGA
 CAAGTGCCTGCTGGATATGAAAGCCATGGACAGTAAGTCAAACGGCGCCATCGCTTGGAG
 CAATCAGACATCCTTCACTTGCCAGGATATCTTCAAGGAGACCAACGCAACATACCCATCC
 TCTGACGTGCCCTGTGATGCCACCCTGACAGAGAAGTCTTTCGAAACAGACATGAACCTG
 AATTTTCAGAATCTGAGCGTGATGGGCCTGAGAACTCTGCTGCTGAAGGTCGCTGGGTTT
 AATCTGCTGATGACACTGCGGCTGTGGTCTCATGA

SEQ ID NO: 67 VJ β y AA constante

MGFRLCCVAFCLL GAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVYWYQQSLDQGL
 QFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSDGGGVYEQYFGP
 GTRLTVTEDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGV
 STDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV
 5 TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

SEQ ID NO: 68 VJ β y AA constante (murino)

MGFRLCCVAFCLL GAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVYWYQQSLDQGL
 QFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSDGGGVYEQYFGP
 GTRLTVTEDL RNVTPPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGV
 CTD PQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPV TQNI
 10 SAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SGLVLMAMVKKKNS

SEQ ID NO: 69 VJ β y NT constante

ATGGGCTTCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGCCTTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTGGAT
 TCTGGAGTCACACAAACCCCAAAGCACCTGATCACAGCAACTGGACAGCGAGTGACGCTG
 AGATGCTCCCCTAGGTCTGGAGACCTCTCTGTGTACTGGTACCAACAGAGCCTGGACCAG
 GGCCTCCAGTTCTCATTAGTATTATAATGGAGAAGAGAGAGCAAAAGGAAACATTCTTG
 AACGATTCTCCGCACAACAGTTCCCTGACTTGCACTCTGAACTAAACCTGAGCTCTCTGGA
 GCTGGGGGACTCAGCTTTGTATTTCTGTGCCAGCAGCGACGGAGGGGGCGTCTACGAGC
 AGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCA
 CCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACA
 CTGGTATGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAA
 TGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCC
 GCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGG
 CAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGAC
 GAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGG
 GTAGAGCAGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCTGTCTGCCACCA
 TCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCG
 15 TGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

SEQ ID NO: 70 VJ β y NT constante co

ATGGGCTTCAGACTGCTGTGCTGCGTGGCCTTCTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGA
TAGCGGCGTGACACAGACACCCAAGCACCTGATCACCGCCACCGGCCAGCGCGTGACAC
TGAGATGTAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGCGTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTGGAC
CAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAACGGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACAT
CCTGGAACGGTTCAGCGCCCAGCAGTTCCTCCCGATCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCA
GCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCTGTGCCAGCTCTGATGGCGGCGGAGTG
TACGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACTGACCGTGACCGAGGACCTGAAGAACGT
GTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGA
AAGCCACCCTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAACCTGTCTTGGT
GGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTGTCCACCGATCCCCAGCCTCTGAAAAGAA
CAGCCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGTCCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCAC
CTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGA
GAACGACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCCGAAG
CCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGC
GCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCT
GCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCTAA

5

SEQ ID NO: 71 Reservada.

SEQ ID NO: 72 VJ β y NT constante (murino) co

ATGGGCTTCAGACTGCTGTGCTGCGTGGCCTTCTGTCTGCTGGGAGCCGGCCCTGTGGA
TAGCGGCGTGACACAGACACCCAAGCACCTGATCACCGCCACCGGCCAGCGCGTGACAC
TGAGATGTAGCCCTAGAAGCGGCGACCTGAGCGTGTACTGGTATCAGCAGAGCCTGGAC
CAGGGCCTGCAGTTCCTGATCCAGTACTACAACGGCGAGGAACGGGCCAAGGGCAACAT
CCTGGAACGGTTCAGCGCCCAGCAGTTCCTCCCGATCTGCACAGCGAGCTGAACCTGAGCA
GCCTGGAACCTGGGCGACAGCGCCCTGTACTTCTGTGCCAGCTCTGATGGCGGCGGAGTG
TACGAGCAGTACTTCGGCCCTGGCACCAGACTGACCGTGACCGAAGATCTACGTAACGTG
ACACCACCCAAAGTCTCACTGTTTGAGCCTAGCAAGGCAGAAATTGCCAACAAGCAGAAG
GCCACCCTGGTGTGCCTGGCAAGAGGGTTCTTTCCAGATCACGTGGAGCTGTCCTGGTG
GGTCAACGGCAAAGAAGTGCATTCTGGGGTCTGCACCGACCCCCAGGCTTACAAGGAGA
GTAATTACTCATATTGTCTGTCAAGCCGGCTGAGAGTGTCCGCCACATTCTGGCACAACCC
TAGGAATCATTTCCGCTGCCAGGTCCAGTTTCACGGCCTGAGTGAGGAAGATAAATGGCC
AGAGGGGTACCTAAGCCAGTGACACAGAACATCAGCGCAGAAAGCCTGGGGACGAGCAG
ACTGTGGCATTACTAGCGCCTCCTATCATCAGGGCGTGCTGAGCGCCACTATCCTGTACG
AGATTCTGCTGGGAAAGGCCACCCTGTATGCTGTGCTGGTCTCCGGCCTGGTGCTGATGG
CCATGGTCAAGAAAAAGAACTCT

10

En la Figura 20 demostramos la reactividad de las células T específicas de PRAME contra diferentes muestras de AML primaria derivadas de pacientes que padecen AML en el momento del diagnóstico. Las muestras de AML que se analizaron fueron HLA-A*0201 (41 muestras), una muestra de AML fue negativa para HLA-A2 (AML 54). En la Figura 20 se muestra tanto la reactividad del clon de células T (B) como la expresión de PRAME medida por qPCR (A).

15

Las muestras de AML primaria se analizaron para el reconocimiento por células T específicas de PRAME. De las 42 muestras de AML, 41 fueron positivas para HLA-A*02:01, 1 negativa para HLA-A*02:01 (AML 54). De las 41 muestras de AML HLA-A*02:01+, las células T específicas de PRAME reconocieron eficazmente 9 muestras de AML. Las muestras de AML con expresión de PRAME >2.5 % en relación con el nivel de expresión de PRAME medido en la estirpe celular de melanoma Mel1.14 (establecido en 100 %) se reconocieron de manera eficiente por las células T específicas de PRAME.

20

Los resultados demuestran que cuando la expresión de PRAME en las muestras de AML es >2.5 % en relación con el nivel de expresión de PRAME medido en la estirpe celular de melanoma Mel1.14 (establecido en 100 %), las células T específicas de PRAME pueden reaccionar eficazmente contra las muestras de AML. Estos resultados indican que aproximadamente el 20-25 % de los pacientes con AML positivos para HLA-A*0201 se pueden tratar con la transferencia del gen PRAME-TCR. Además, los resultados demuestran que la medición de la expresión de PRAME de la muestra de AML mediante qPCR se puede utilizar para determinar si es de beneficio potencial para el paciente tratar con células T modificadas con PRAME-TCR.

Ejemplo 2: Adición de un gen suicida -- Apoptosis selectiva de las células modificadas

Se pueden proporcionar células modificadas que expresan el TCR dirigido por PRAME con un mecanismo para eliminar algunas o todas las células si el paciente experimenta efectos negativos y existe la necesidad de reducir o interrumpir el tratamiento. Estas células se pueden utilizar para todas las células T modificadas que expresan TCR, o a las células se les puede proporcionar esta capacidad cuando el TCR se dirige contra antígenos que previamente han causado, o corren el riesgo de causar, toxicidad en diana y fuera del órgano letal, donde existe la necesidad de una opción para terminar rápidamente la terapia.

En los presentes ejemplos se proporciona un ejemplo de un polipéptido quimérico que se puede expresar en las células modificadas. En estos ejemplos, el vector de ácido nucleico codifica un único polipéptido. El polipéptido de caspasa-9 inducible se separa del polipéptido de CAR durante la traducción, debido a la omisión de un enlace de péptidos. (Donnelly, ML 2001, J. Gen. Virol. 82:1013-25).

Construcción de vectores y confirmación de expresión.

En el presente documento se presenta un interruptor de seguridad que se puede expresar de manera estable y eficiente en células T humanas. Se construyeron vectores de expresión adecuados para uso como agentes terapéuticos que incluían una actividad de caspasa-9 humana modificada fusionada con una proteína de unión a FK506 humana (FKBP), tal como, por ejemplo, FKBP12v36. La actividad híbrida de caspasa-9/FK506 se puede dimerizar utilizando un producto farmacéutico de molécula pequeña. Las versiones de longitud completa, truncadas y modificadas de la actividad de caspasa-9 se fusionaron con el dominio de unión al ligando, o región de multimerización, y se insertaron en el vector retroviral MSCV.IRES.GRP, que también permite la expresión del marcador fluorescente, GFP.

La molécula de caspasa-9 inducible de longitud completa (F'-FC-Casp9) incluye 2, 3 o más proteínas de unión a FK506 (FKBP, por ejemplo, variantes de FKBP12v36) ligadas con un ligador Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser a la subunidad pequeña y grande de la molécula de caspasa. Caspasa-9 inducible de longitud completa (F'-C-Casp9.I.GFP) tiene una caspasa-9 de longitud completa, también incluye un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD; GenBank NM001 229) ligado a 2 proteínas de unión FK506 humanas de 12 kDa (FKBP12; GenBank AH002 818) que contienen una mutación F36V. La secuencia de aminoácidos de una o más de las FKBP (F') se alteró en los codones (por ejemplo, el tercer nucleótido de cada codón de aminoácido se alteró por una mutación silenciosa que mantuvo el aminoácido codificado originalmente) para evitar la recombinación homóloga cuando se expresa en un retrovirus. F'-C-Casp9C3S incluye una mutación de cisteína a serina en la posición 287 que interrumpe su sitio de activación. En las construcciones F'-Casp9, F-C-Casp9 y F'-Casp9, se suprimieron el dominio de activación de caspasa (CARD), un FKBP o ambos, respectivamente. Todas las construcciones se clonaron en MSCV.IRES.GFP como fragmentos EcoRI-XhoI.

La coexpresión de las construcciones inducibles de caspasa-9 del tamaño esperado con el gen marcador GFP en células 293 T transfectadas se demostró mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo de caspasa-9 específico para los residuos de aminoácidos 299-318, presentes tanto en la molécula de caspasa de longitud completa como en la truncada, así como un anticuerpo específico de GFP.

Un cribado inicial indicó que el iCasp9 de longitud completa no se podía mantener estable en niveles altos en las células T, posiblemente debido a que las células transducidas se eliminaban por la actividad basal del transgén. El dominio CARD está involucrado en la dimerización fisiológica de las moléculas de caspasa-9, mediante una interacción impulsada por el citocromo C y el trifosfato de adenosina (ATP) con el factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1). Debido al uso de un CID para inducir la dimerización y la activación del interruptor suicida, la función del dominio CARD es superflua en este contexto y se investigó la eliminación del dominio CARD como un método para reducir la actividad basal.

Uso del gen suicida iCasp9 para mejorar la seguridad de las células T aloagotadas después del trasplante de células madre haploideénticas

En este ejemplo se presentan construcciones de expresión y métodos para utilizar las construcciones de expresión para mejorar la seguridad de las células T aloagotadas después del trasplante de células madre haploideénticas. Se pueden utilizar métodos similares para expresar las construcciones de expresión de caspasa-9 en células sin aloagotamiento. Se generó un vector retroviral que codifica iCasp9 y un marcador seleccionable (CD19 truncado) como interruptor de seguridad para las células T del donante. Incluso después del aloagotamiento (usando inmunotoxina anti-CD25), las células T del donante podrían transducirse, expandirse y posteriormente enriquecerse de manera eficiente mediante selección inmunomagnética de CD19 hasta una pureza >90 %. Las células modificadas por ingeniería conservaron la

especificidad y la funcionalidad antivirales y contenían un subconjunto con fenotipo y función reguladores. La activación de iCasp9 con un dimerizador de molécula pequeña produjo rápidamente >90 % de apoptosis. Aunque la expresión del transgén se reguló a la baja en las células T inactivas, iCasp9 siguió siendo un gen suicida eficiente, ya que la expresión se reguló al alza rápidamente en las células T activadas (alorreactivas).

5

Materiales y métodos

Generación de células T aloagotadas

10 Se generaron células aloagotadas de voluntarios sanos como se presentó anteriormente. Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos se cocultivaron con estirpes celulares linfoblastoides (LCL) transformadas con el virus de Epstein Barr (EBV) del receptor irradiado en una relación de respondedor a estimulador de 40: 1 en medio sin suero (AIM V; Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 72 horas, las células T activadas que expresaban CD25 se agotaron del cocultivo mediante incubación durante la noche en inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA. El aloagotamiento se consideró adecuada si el CD3⁺CD25⁺ residual la población fue <1% y la proliferación residual por incorporación de 3H-timidina fue <10 %.

15

Plásmido y retrovirus

20 SFG.iCasp9.2A.CD19 consiste en caspasa-9 inducible (iCasp9) ligada, a través de una secuencia escindible similar a 2A, a CD19 humano truncado. iCasp9 consiste en una proteína de unión a FK506 humana (FKBP12; GenBank AH002 818) con una mutación F36V, conectada mediante un ligador Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly a la caspasa-9 humana (CASP9; GenBank NM 001229). La mutación F36V aumenta la afinidad de unión de FKBP12 al homodimerizador sintético, AP20187 o AP1903. El dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) se suprimió de la secuencia de caspasa-9 humana porque su función fisiológica se reemplazó por FKBP12 y su eliminación aumenta la expresión y la función del transgén. 25 La secuencia similar a 2A codifica un péptido de 20 aminoácidos del virus del insecto Thosea asigna, que media >99 % en la escisión entre una glicina y un residuo de prolina terminal, lo que da como resultado 19 aminoácidos adicionales en el terminal C de iCasp9 y un residuo de prolina adicional en el terminal N de CD19. CD19 consiste en CD19 de longitud completa (GenBank NM 001770) truncado en el aminoácido 333 (TDPTRRF), que acorta el dominio intracitoplasmático de 242 a 19 aminoácidos y elimina todos los residuos de tirosina conservados que son sitios potenciales para la fosforilación. 30

Se preparó un retrovirus seudotipado del virus de la leucemia del simio Gibbon (Gal-V) que produce un clon PG13 estable mediante la transfección transitoria de la estirpe celular Phoenix Eco (producto ATCC #SD3444; ATCC, Manassas, VA) con SFG.iCasp9.2A.CD19. Esto produjo un retrovirus ecopseudotipado. La estirpe celular de empaque PG13 (ATCC) se transdujo tres veces con Eco-pseudotipado o retrovirus para generar una línea productora que contenía múltiples integrantes provirales SFG.iCasp9.2A.CD19 por célula. Se realizó la clonación de células individuales y el clon de PG13 que produjo el título más alto se expandió y utilizó para la producción de vectores. 35

Transducción retroviral

El medio de cultivo para la activación y expansión de células T consistió en RPMI 1640 al 45 % (Hyclone, Logan, UT), Clicks al 45 % (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y suero bovino fetal al 10 % (FBS; Hyclone). Las células aloagotadas se activaron con anti-CD3 inmovilizado (OKT3; Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) durante 48 horas antes de la transducción con vector retroviral. El aloagotamiento selectivo se realizó cocultivando PBMC del donante con EBV-LCL del receptor para activar las células alorreactivas: las células activadas expresaron CD25 y posteriormente se eliminaron por la inmunotoxina anti-CD25. Las células aloagotadas se inactivaron por OKT3 y transdujeron con el vector retroviral 48 horas más tarde. La selección inmunomagnética se realizó el día 4 de la transducción; la fracción positiva se expandió durante 4 días más y se criopreservó. 40

50

En experimentos a pequeña escala, se recubrieron placas de 24 pocillos no tratadas con cultivo de tejidos (Becton Dickinson, San Jose, CA) con OKT3 1 g/ml durante 2 a 4 horas a 37 °C. Se agregaron células aloagotadas en 1×10^6 células por pocillo. A las 24 horas, se agregaron 100 U/ml de interleucina-2 humana recombinante (IL-2) (Proleukin; Chiron, Emeryville, CA). La transducción retroviral se realizó 48 horas después de la activación. Las placas de 24 pocillos no tratadas con cultivo de tejidos se recubrieron con fragmento de fibronectina recombinante 3.5 ug/cm² (CH-296; retronectina; Takara Mirus Bio, Madison, WI) y los pocillos se cargaron dos veces con sobrenadante que contenía vector retroviral a razón de 0.5 ml por pocillo durante 30 minutos a 37 °C, después de lo cual se sembraron células activadas con OKT3 en 5×10^5 células por pocillo en sobrenadante fresco que contiene vector retroviral y medio de cultivo de células T en una relación de 3:1, complementado con 100 U/ml de IL-2. Las células se recogieron después de 2 a 3 días y se expandieron en presencia de 50 U/ml de IL-2. 55 60

Aumento de la producción de células aloagotadas modificadas genéticamente

El aumento del proceso de transducción para la aplicación clínica utilizó matraces T75 no tratados con cultivo de tejidos (Nunc, Rochester, NY), que se recubrieron con 10 ml de OKT3 1 µg/ml o 10 ml de fibronectina 7 µg/ml a 4 °C durante la noche. También se utilizaron bolsas de etileno propileno fluorado tratadas con corona para aumentar la adherencia celular 65

- (2PF-0072AC, American Fluoroseal Corporation, Gaithersburg, MD). Las células aloagotadas se sembraron en matraces recubiertos con OKT3 a 1×10^6 células/ml. Se agregaron 100 U/ml de IL-2 al día siguiente. Para la transducción retroviral, los matraces o bolsas recubiertos con retronectina se cargaron una vez con 10 ml de sobrenadante que contenía retrovirus durante 2 a 3 horas. Se sembraron células T activadas con OKT3 a 1×10^6 células/ml en medio fresco que contenía vector retroviral y medio de cultivo de células T en una relación de 3:1, complementado con 100 U/ml de IL-2. Las células se recogieron a la mañana siguiente y se expandieron en matraces T75 o T175 tratados con cultivo de tejidos en medio de cultivo suplementado con entre aproximadamente 50 y 100 U/ml de IL-2 a una densidad de siembra de entre aproximadamente 5×10^5 células/ml a 8×10^5 células/ml.
- 5 Selección inmunomagnética de CD19
- La selección inmunomagnética para CD19 se realizó 4 días después de la transducción. Las células se marcaron con microesferas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos CD19 anti-humano de ratón monoclonales (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionaron en columnas MS o LS en experimentos a pequeña escala y en un dispositivo de selección automatizado CliniMac Plus en experimentos a gran escala. Las células seleccionadas con CD19 se expandieron durante 4 días más y se criopreservaron el día 8 después de la transducción. Estas células se denominaron "células aloagotadas modificadas genéticamente".
- 15 Inmunofenotipificación y análisis de pentámeros
- El análisis de citometría de flujo (software FACSCalibur y CellQuest; Becton Dickinson) se realizó utilizando los siguientes anticuerpos: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD56 y CD62L. Se encontró que CD19-PE (Clon 4G7; Becton Dickinson) proporcionaba una tinción óptima y se utilizó en todos los análisis posteriores. Se utilizó un control no transducido para establecer la puerta negativa para CD19. Se utilizó un pentámero HLA, HLA-B8-RAKFKQLL (Proimmune, Springfield, VA) para detectar células T que reconocen un epítipo del antígeno lítico de EBV (BZLF1). Se utilizó el pentámero HLA-A2-NLVPMTATV para detectar células T que reconocían un epítipo del antígeno CMV-pp65.
- 20 Inducción de apoptosis con inductor químico de dimerización, AP20187
- La funcionalidad del gen suicida se valoró al agregar un homodimerizador sintético de molécula pequeña, AP20187 (Ariad Pharmaceuticals; Cambridge, MA), a una concentración final de 10 nM el día siguiente a la selección inmunomagnética de CD19. También se puede utilizar AP1903. Las células se tiñeron con anexina V y 7-amino-actinomicina (7-AAD) (BD Pharmingen) a las 24 horas y se analizaron por citometría de flujo. Las células negativas tanto para anexina V como para 7-AAD se consideraron viables, las células positivas para anexina V fueron apoptóticas y las células positivas para anexina V y 7-AAD fueron necróticas. El porcentaje de destrucción inducida por la dimerización se corrigió para la viabilidad del valor de referencia de la siguiente manera: Porcentaje de destrucción = $100\% - (\% \text{ de Viabilidad en células tratadas con AP20187} \div \% \text{ de Viabilidad en células no tratadas})$.
- 30 Valoración de la expresión del transgén después de un cultivo prolongado y reactivación
- Las células se mantuvieron en medio de células T que contenía 50 U/ml de IL-2 hasta 22 días después de la transducción. Una porción de las células se reactivó sobre placas de 24 pocillos recubiertas con 1 g/ml de OKT3 y 1 microgramo/ml de anti-CD28 (clon CD28.2, BD Pharmingen, San José, CA) durante 48 a 72 horas. La expresión de CD19 y la función del gen suicida en células reactivadas y no reactivadas se midieron el día 24 o 25 después de la transducción.
- 35 En algunos experimentos, las células también se cultivaron durante 3 semanas después de la transducción y se estimularon con PBMC alogénicas irradiadas con 30Gy en una relación de respondedor:estimulador de 1:1. Después de 4 días de cocultivo, una porción de las células se trató con AP20187 10 nM. La destrucción se midió mediante tinción con anexina V/7-AAD a las 24 horas, y el efecto del dimerizador sobre células T específicas de virus testigo se valoró mediante análisis de pentámero en células tratadas con AP20187 y sin tratar.
- 40 Las condiciones de cultivo óptimas para mantener la competencia inmunológica de las células T modificadas con genes suicidas se deben determinar y definir para cada combinación de interruptor de seguridad, marcador seleccionable y tipo de célula, ya que el fenotipo, el repertorio y la funcionalidad se pueden ver afectados por la estimulación utilizada para la activación de células T policlonales, el método de selección de células transducidas y duración del cultivo.
- 45 Ensayo clínico de fase I de células T aloagotadas transducidos con gen suicida de caspasa-9 inducible después de un trasplante de células madre haploidénticas
- Este ejemplo presenta los resultados de un ensayo clínico de fase 1 que utiliza una estrategia alternativa de genes suicidas. Brevemente, las células mononucleares de sangre periférica del donante se cocultivaron con células linfoblastoides transformadas con EBV irradiadas del receptor (40: 1) durante 72 horas, se aloagotaron con una inmunotoxina CD25 y luego se transdujeron con un sobrenadante retroviral que llevaba el gen suicida iCasp9 y un marcador de selección (Δ CD19); Δ CD19 permitió el enriquecimiento a $>90\%$ de pureza mediante selección inmunomagnética.
- 50
- 55
- 60
- 65

En el presente documento se proporciona un ejemplo de un protocolo para la generación de un producto de terapia celular.

Material de origen

- 5 Se obtuvieron hasta 240 ml (en 2 recolecciones) de sangre periférica del donante trasplantado de acuerdo con los protocolos establecidos. En algunos casos, dependiendo del tamaño del donante y del receptor, se realizó una leucoféresis para aislar suficientes células T. También se extrajeron 10-30 cc de sangre del receptor y se utilizaron para generar la estirpe celular linfoblastoide transformada con el virus de Epstein Barr (EBV) que se utilizó como células estimuladoras. En algunos casos, según el historial médico y/o la indicación de un recuento bajo de células B, se generaron los LCL utilizando células mononucleares de sangre periférica apropiadas de un familiar de primer grado (por ejemplo, padre, hermano o hijo).

Generación de células aloagotadas

- 15 Se generaron células aloagotadas a partir de los donantes de trasplante tal como se presenta en el presente documento. Se cocultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con estirpes celulares linfoblastoides (LCL) transformadas con el virus de Epstein Barr (EBV) del receptor irradiado en una relación de respondedor a estimulador de 40:1 en medio sin suero (AIM V; Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 72 horas, las células T activadas que expresan CD25 se agotaron del cocultivo mediante incubación durante la noche en inmunotoxina RFT5-SMPT-dgA. El aloagotamiento se considera adecuado si la población CD3⁺CD25⁺ residual fue <1% y la proliferación residual por incorporación de 3H-timidina fue <10 %.

Producción retroviral

- 25 Se generó un clon de línea productora retroviral para la construcción iCasp9-ΔCD19. También se generó un banco celular maestro del productor. Se realizaron pruebas del banco de células maestras para excluir la generación de retrovirus competentes para la replicación y la infección por Mycoplasma, HIV, HBV, HCV y similares. La línea productora se hizo crecer hasta la confluencia, se recogió el sobrenadante, se filtró, se dividió en alícuotas y se congeló rápidamente y se almacenó a -80 °C. Se realizaron pruebas adicionales en todos los lotes de sobrenadante retroviral para excluir el Retrovirus Competente en Replicación (RCR) y se emitió un certificado de análisis, según el protocolo.

Transducción de células aloagotadas

- 35 Se transdujeron linfocitos T aloagotados utilizando fibronectina. Las placas o bolsas se recubrieron con fragmento de fibronectina recombinante CH-296 (RetronectinTM, Takara Shuzo, Otsu, Japón). El virus se unió a la retronectina al incubar el sobrenadante productor en placas o bolsas recubiertas. A continuación, las células se transfirieron a placas o bolsas recubiertas de virus. Después de la transducción, las células T aloagotadas se expandieron, alimentándolas con IL-2 dos veces por semana para alcanzar el número suficiente de células según el protocolo.

- 40 Selección inmunomagnética CD19

- La selección inmunomagnética para CD19 se realizó 4 días después de la transducción. Las células se marcan con microesferas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos CD19 anti-humano de ratón monoclonales (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) y se seleccionan sobre un dispositivo de selección automatizado CliniMacs Plus. Dependiendo del número de células requeridas para la infusión clínica, las células se criopreservaron después de la selección de CliniMacs o se expandieron más con IL-2 y se criopreservaron el día 6 o el día 8 después de la transducción.

Congelación

- 50 Se retiraron alícuotas de células para probar la eficiencia de transducción, la identidad, el fenotipo y el cultivo microbiológico según lo requerido por la FDA para la prueba de liberación final. Las células se criopreservaron antes de la administración de acuerdo con el protocolo.

Fármacos de estudio

- 55 RFT5-SMPT-dgA

- RFT5-SMPT-dgA es un anti-CD25 IgG1 murino (cadena α del receptor de IL-2) conjugada a través de un entrecruzador heterobifuncional [N-succinimidiloxycarbonil-α-metil-d- (2-piridiltio) tolueno] (SMPT) para desglicosilar químicamente la cadena A de ricina (dgA). RFT5-SMPT-dgA está formulado como una solución estéril a 0.5 mg/ml.

Homodimerizador sintético, AP1903

- 65 Mecanismo de acción: La muerte celular inducible por AP1903 se logra mediante la expresión de una proteína quimérica que comprende la porción intracelular del receptor humano (proteína de caspasa-9), que señala la muerte celular apoptótica, fusionada con un dominio de unión a fármacos derivado de la proteína de unión a FK506 humana (FKBP).

Esta proteína quimérica permanece inactiva dentro de las células hasta la administración de AP1903, que entrecruza los dominios FKBP, iniciando la señalización de caspasa y la apoptosis.

Toxicología: AP1903 ha sido evaluado como un Nuevo Fármaco en Investigación (IND) por la FDA y ha completado con éxito un estudio de seguridad clínica de fase I. No se observaron efectos adversos significativos cuando se administró API 903 en un rango de dosis de 0.01 mg/kg a 1.0 mg/kg.

Farmacología/Farmacocinética: Los pacientes recibieron 0.4 mg/kg de AP1903 como una infusión de 2 h, en base a los datos de Pk publicados que muestran concentraciones plasmáticas de 10 ng/ml - 1275 ng/ml en el rango de dosis de 0.01 mg/kg a 1.0 mg/kg con niveles plasmáticos en descenso al 18% y al 7% del máximo a las 0.5 y 2 horas después de la dosis.

Perfil de efectos secundarios en humanos: No se produjeron eventos adversos graves durante el estudio de Fase 1 en voluntarios. La incidencia de eventos adversos fue muy baja después de cada tratamiento, siendo todos los eventos adversos de gravedad leve. Solo se consideró un evento adverso posiblemente relacionado con API903. Este fue un episodio de vasodilatación, presentado como "enrojecimiento facial" para 1 voluntario a la dosificación de 1.0 mg/kg de API903. Este evento ocurrió 3 minutos después del inicio de la infusión y se resolvió después de 32 minutos de duración. El investigador consideró que todos los demás eventos adversos informados durante el estudio no estaban relacionados o tenían una relación improbable con el fármaco del estudio. Estos eventos incluyeron dolor torácico, síndrome gripal, halitosis, dolor de cabeza, dolor en el lugar de la inyección, vasodilatación, aumento de la tos, rinitis, sarpullido, hemorragia de las encías y equimosis.

Los pacientes que desarrollaron GvHD de grado 1 se trataron con 0.4 mg/kg de AP1903 en una infusión de 2 horas. Los protocolos para la administración de AP1903 a pacientes con GvHD de grado 1 se establecieron de la siguiente manera. A los pacientes que desarrollan GvHD después de la infusión de células T aloagotadas se les realiza una biopsia para confirmar el diagnóstico y reciben 0.4 mg/kg de AP1903 como una infusión de 2 h. Los pacientes con GvHD de grado 1 no recibieron ninguna otra terapia inicialmente, sin embargo, si mostraban una progresión de la GvHD, se administró la terapia convencional de GvHD según las pautas institucionales. A los pacientes que desarrollaron GvHD de grados 2-4 se les administró terapia inmunosupresora sistémica estándar según las pautas institucionales, además del fármaco dimerizador AP1903.

Instrucciones de preparación e infusión: el AP1903 para inyección se obtiene como una solución concentrada de 2.33 ml en un vial de 3 ml, a una concentración de 5 mg/ml (es decir, 10.66 mg por vial). Antes de la administración, la dosis calculada se diluyó a 100 ml en solución salina normal al 0.9 % para infusión. El AP1903 para inyección (0.4 mg/kg) en un volumen de 100 ml se administró mediante infusión IV durante 2 horas, utilizando un equipo de infusión esterilizado sin DEHP, sin óxido de etileno y una bomba de infusión.

La construcción de expresión del gen suicida iCasp9 (por ejemplo, SFG.iCasp9.2A.ΔCD19) consiste en caspasa-9 inducible (iCasp9) ligada, a través de una secuencia escindible similar a 2A, a CD19 humano truncado (ΔCD19). iCasp9 incluye una proteína de unión a FK506 humana (FKBP12; GenBank AH002 818) con una mutación F36V, conectada mediante un ligador Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly a la caspasa-9 humana (CASP9; GenBank NM 001229). La mutación F36V puede aumentar la afinidad de unión de FKBP12 al homodimerizador sintético, AP20187 o API903. El dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) se suprimió de la secuencia de caspasa-9 humana y su función fisiológica se reemplazó por FKBP12. El reemplazo de CARD por FKBP12 aumenta la expresión y la función del transgén. La secuencia similar a 2A codifica un péptido de 18 aminoácidos del virus del insecto Thossea Asigna, que media >99 % en la escisión entre una glicina y un residuo de prolina terminal, lo que da como resultado 17 aminoácidos adicionales en el terminal C de iCasp9 y un residuo de prolina adicional en el terminal N de CD19. ΔCD19 consiste en CD19 de longitud completa (GenBank NM 001770) truncado en el aminoácido 333 (TDPTRRF), que acorta el dominio intracitoplasmático de 242 a 19 aminoácidos y elimina todos los residuos de tirosina conservados que son sitios potenciales para la fosforilación.

Estudios in vivo

Tres pacientes recibieron Células T iCasp9⁺ después de trasplante de células madre haplo-CD34⁺ (SCT), a niveles de dosis entre aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 3×10^6 células/kg.

Las células T infundidas se detectaron in vivo mediante citometría de flujo (CD3⁺ ΔCD19⁺) o qPCR tan pronto como el día 7 después de la infusión, con una expansión máxima de 170 ± 5 veces (día 29 $\pm$ 9 después de infusión). Dos pacientes desarrollaron aGvHD de grado I/II y la administración de AP1903 provocó una ablación >90 % de células CD3⁺ ΔCD19⁺, dentro de los 30 minutos de la infusión, con una reducción logarítmica adicional dentro de las 24 horas, y resolución de la aGvHD de la piel y el hígado dentro de las 24 horas, lo que demuestra que el transgén iCasp9 era funcional in vivo.

Los experimentos ex vivo confirmaron estos datos. Además, las células T aloagotadas residuales se podían expandir y eran reactivas contra virus (CMV) y hongos (*Aspergillus fumigatus*) (producción de IFN-γ). Estos estudios in vivo encontraron que una sola dosis de fármaco dimerizador puede reducir o eliminar la subpoblación de células T que causan la GvHD, pero puede evitar los CTL específicos del virus, que luego pueden volver a expandirse.

Reconstitución inmunitaria

Dependiendo de la disponibilidad de células y reactivos del paciente, se pueden obtener estudios de reconstitución inmunitaria (inmunofenotipificación, función de células T y B) a intervalos en serie después del trasplante. Se analizarán 5 varios parámetros que miden la reconstitución inmune resultante de las células T aloagotadas transducidas con icaspasa. El análisis incluye mediciones repetidas de recuentos de linfocitos totales, números de células T y CD19 B y análisis FACS de subconjuntos de células T (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD27, CD28, CD44, CD62L, CCR7, CD56, CD45RA, CD45RO, receptores de células T alfa/beta y gamma/delta). Dependiendo de la disponibilidad de células T de un paciente, también se analizan marcadores de células T reguladoras como CD41CD251FoxP3. Se extraen aproximadamente 10-60 10 ml de sangre del paciente, cuando es posible, 4 horas después de la infusión, semanalmente durante 1 mes, mensualmente x 9 meses y luego al año y 2 años. La cantidad de sangre extraída depende del tamaño del receptor y no supera los 1-2 cc/kg en total (teniendo en cuenta la sangre extraída para la atención clínica y la evaluación del estudio) en cualquier extracción de sangre.

15 Administración de células T transfectadas o transformadas no aloagotadas

Los protocolos proporcionados en el presente documento para la generación y administración de células T que expresan un TCR específico de PRAME y un polipéptido de caspasa inducible también se pueden modificar para proporcionar aloagotamiento de células T in vivo si es necesario después de que el paciente muestre síntomas tóxicos. Para extender 20 el enfoque a un grupo más grande de sujetos que se podrían beneficiar de la reconstitución inmunitaria sin GvHD aguda, el protocolo puede simplificarse al proporcionar un método in vivo de agotamiento de células T. En el método de pretratamiento de aloagotamiento, como se discute en el presente documento, las estirpes celulares linfoblastoides transformadas por EBV se preparan primero a partir del receptor, que luego actúan como células presentadoras de aloantígenos. Este procedimiento puede demorar hasta 8 semanas y puede fallar en pacientes con neoplasias malignas 25 tratados previamente de manera extensa, particularmente si recibieron rituximab como componente de su terapia inicial. Posteriormente, las células T del donante se cocultivan con el EBV-LCL del receptor, y las células T alorreactivas (que expresan el antígeno de activación CD25) se tratan luego con el anticuerpo monoclonal conjugado con ricina CD25. Este procedimiento puede requerir muchos días adicionales de trabajo de laboratorio para cada sujeto.

30 El proceso se puede simplificar al utilizar un método in vivo de aloagotamiento, basándose en el rápido agotamiento in vivo observado de células T alorreactivas por el fármaco dimerizador y el ahorro de células T no estimuladas pero reactivas a virus/hongos.

Si se desarrolla una GvHD aguda de Grado I o mayor u otro evento tóxico, se administra una dosis única de fármaco dimerizador, por ejemplo, una dosis de 0.4 mg/kg de AP1903 como una infusión intravenosa de 2 horas. Se pueden 35 administrar hasta 3 dosis adicionales de fármaco dimerizador a intervalos de 48 horas si persiste la GvHD aguda. En sujetos con GvHD aguda de grado II o mayor, estas dosis adicionales de fármaco dimerizador se pueden combinar con esteroides. Para los pacientes con GVHD persistente que no pueden recibir dosis adicionales del dimerizador debido a una reacción de Grado III o IV al dimerizador, el paciente puede ser tratado solo con esteroides, después de 0 o 1 dosis 40 del dimerizador.

Generación de células T terapéuticas

Se obtienen hasta 240 ml (en 2 recolecciones) de sangre periférica del donante de trasplante de acuerdo con el 45 consentimiento de obtención. Si es necesario, se utiliza una leucaféresis para obtener suficientes células T; (ya sea antes de la movilización de células madre o siete días después de la última dosis de G-CSF). También se pueden recolectar entre 10 y 30 ml adicionales de sangre para detectar enfermedades infecciosas como la hepatitis y el VIH.

Las células mononucleares de sangre periférica se activan utilizando anticuerpos anti-CD3 humanos (por ejemplo, de Orthotech o Miltenyi) el día 0 y se expanden en presencia de interleucina-2 humana recombinante (rhIL-2) el día 2. Las 50 células T activadas con anticuerpos CD3 se transducen mediante el vector retroviral icaspasa-9 en matraces o placas recubiertas con fragmento de fibronectina recombinante CH-296 (Retronectin™, Takara Shuzo, Otsu, Japón). El virus se une a la retronectina al incubar el sobrenadante productor en placas o matraces recubiertos con retronectina. A continuación, las células se transfieren a dispositivos de cultivo de tejidos recubiertos de virus. Después de la transducción, 55 las células T se expanden alimentándolas con rhIL-2 dos veces por semana para alcanzar el número suficiente de células según el protocolo.

Para asegurarse de que la mayoría de las células T infundidas lleven el gen suicida, se puede utilizar un marcador seleccionable, CD19 humano truncado (Δ CD19) y un dispositivo de selección comercial para seleccionar las células 60 transducidas con una pureza >90 %. La selección inmunomagnética para CD19 se puede realizar 4 días después de la transducción. Las células se marcan con microesferas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos CD19 anti-humano de ratón monoclonales (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y se seleccionan sobre un dispositivo de selección automatizado CliniMacs Plus. Dependiendo de la cantidad de células requeridas para la infusión clínica, las células se pueden criopreservar después de la selección de CliniMacs o expandirse aún más con IL-2 y criopreservar tan pronto como se 65 hayan expandido suficientes células (hasta el día 14 desde el inicio del producto).

Se pueden extraer alícuotas de células para realizar pruebas de eficiencia de transducción, identidad, fenotipo, crecimiento autónomo y examen microbiológico según lo requiera la FDA para las pruebas de liberación final. Las células se criopreservan antes de la administración.

5 Generación alternativa de células T terapéuticas

Antes de la leucaféresis de células T no movilizadas, se recogen y registran el hemograma y el diferencial del sujeto. Se realiza la monitorización de enfermedades infecciosas según las pautas regulatorias establecidas. El sujeto debe cumplir con los criterios institucionales de CBC y plaquetas antes del inicio de la leucoféresis. La fracción de leucocitos se recolecta utilizando centrifugación de flujo continuo estandarizada. El sujeto es monitorizado durante la aféresis. Se procesa un procedimiento de aféresis estándar de hasta aproximadamente 3-4 volúmenes de sangre según los procedimientos estándar institucionales, que incluyen las precauciones para pacientes con leucemia. Se documenta y registra el volumen procesado y la duración de la leucoféresis. Si es menos de 5×10^9 se recolectan células mononucleares, se consulta al Monitor Médico.

15 Administración de células T

Las células T transducidas se administran a pacientes, por ejemplo, entre 30 y 120 días después del trasplante de células madre. Las células T criopreservadas se descongelan y se infunden a través de una línea de catéter con solución salina normal. Para los niños, las premedicaciones se dosifican por peso. Las dosis de células pueden variar desde, por ejemplo, aproximadamente 1×10^4 células/kg hasta 1×10^8 células/kg, por ejemplo, desde aproximadamente 1×10^5 células/kg hasta 1×10^7 células/kg, desde aproximadamente 1×10^6 células/kg hasta 5×10^6 células/kg, desde aproximadamente 1×10^4 células/kg hasta 5×10^6 células/kg, por ejemplo, aproximadamente 1×10^4 , aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 2×10^5 , aproximadamente 3×10^5 , aproximadamente 5×10^5 , 6×10^5 , aproximadamente 7×10^5 , aproximadamente 8×10^5 , aproximadamente 9×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 2×10^6 , aproximadamente 3×10^6 , aproximadamente 4×10^6 , o aproximadamente 5×10^6 células/kg.

Tratamiento de la GvHD

Los pacientes que desarrollan GVHD aguda de grado ≥ 1 se tratan con 0.4 mg/kg de AP1903 en una infusión de 2 horas. El AP1903 para inyección se puede proporcionar, por ejemplo, como una solución concentrada de 2.33 ml en un vial de 3 ml, a una concentración de 5 mg/ml (es decir, 10.66 mg por vial). Antes de la administración, la dosis calculada se diluirá a 100 ml en solución salina normal al 0.9 % para infusión. El AP1903 para inyección (0.4 mg/kg) en un volumen de 100 ml se puede administrar mediante infusión IV durante 2 horas, utilizando un equipo de infusión esterilizado sin DEHP ni óxido de etileno y una bomba de infusión.

Programa de tratamiento de muestra

Tiempo	Donante	Receptor
Pre-trasplante	Obtenga hasta 240 ml de sangre o leucoaféresis no estimulada de un donante de trasplante de médula ósea. Prepare las células T y las LCL de donantes para estudios posteriores de reconstitución inmunitaria.	
Día 0	Activación anti-CD3 de PBMC	
Día 2	Alimentación de IL-2	
Día 3	Transducción	
Día 4	Expansión	
Día 6	Selección de CD19. Criopreservación (*si se cumple la dosis requerida)	
Día 8	Valore la eficiencia de la transducción y la funcionalidad del transgén iCaspasa9 por fenotipo. Criopreservación (*si aún no se ha realizado)	
Día 10 o Día 12 a Día 14	Criopreservación (si aún no se ha realizado)	
De 30 a 120 días después del trasplante		Descongele e infunda las células T de 30 a 120 días después de la infusión de células madre.

Los métodos para utilizar polipéptidos quiméricos de caspasa-9 para inducir la apoptosis se discuten en la Publicación PCT Número WO 2011/146862 de Malcolm K. Brenner et al., titulada Métodos para inducir apoptosis selectiva, presentada el 20 de mayo de 2011, y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Número US 2011/0286980 de Malcolm K. Brenner et al., titulada Métodos para inducir la apoptosis selectiva, presentada el 20 de mayo de 2011.

Referencias bibliográficas citadas o que brindan apoyo adicional al presente ejemplo

1. Seifert, R. and K. Wenzel-Seifert, Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2002. 366(5): p. 381-416.
2. Roose, J.P., et al., T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biol*, 2003. 1(2): p. E53.
3. Tze, L.E., et al., Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol*, 2005. 3(3): p. e82.
4. Schram, B.R., et al., B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. *J Immunol*, 2008. 180(7): p. 4728-41.
5. Schram, B.R., et al., B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements. *J Immunol*, 2008. 180(7): p. 4728-41.
6. Randall, K.L., et al., Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nat Immunol*, 2009. 10(12): p. 1283-91.
7. Kouskoff, V., et al., B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000. 97(13): p. 7435-9.
8. Hong, T., et al., A simple theoretical framework for understanding heterogeneous differentiation of CD4+ T cells. *BMC Syst Biol*, 2012. 6: p. 66.
9. Rudd, M.L., A. Tua-Smith, and D.B. Straus, Lck SH3 domain function is required for T cell receptor signals regulating thymocyte development. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(21): p. 7892-900.
10. Sorkin, A. and M. von Zastrow, Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(9): p. 609-22.
11. Luning Prak, E.T., M. Monestier, and R.A. Eisenberg, B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci*, 2011. 1217: p. 96-121.
12. Boss, W.F., et al., Basal signaling regulates plant growth and development. *Plant Physiol*, 2010. 154(2): p. 439-43.
13. Tao, Y.X., Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther*, 2008. 120(2): p. 129-48.
14. Spiegel, A.M., Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu Rev Physiol*, 1996. 58: p. 143-70.
15. Shiozaki, E.N., et al., Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*, 2003. 11(2): p. 519-27.
16. Renatus, M., et al., Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14250-5.
17. Shi, Y., Mechanisms of Caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002. 9(3): p. 459-70.
18. Shiozaki, E.N., J. Chai, and Y. Shi, Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): p. 4197-202.
19. Straathof, K.C., et al., An inducible caspase-9 safety switch for T cell therapy. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4247-54.
20. MacCorkle, R.A., K.W. Freeman, and D.M. Spencer, Synthetic activation of Caspases: artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(7): p. 3655-60.
21. Di Stasi, A., et al., Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*, 2011. 365(18): p. 1673-83.
22. Chang, W.C., et al., Modifying ligand-induced and constitutive signaling of the human 5-HT4 receptor. *PLoS One*, 2007. 2(12): p. e1317.
23. Bloom, J.D. and F.H. Arnold, In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106 Suppl 1: p. 9995-10000.
24. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, Mechanisms of Caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(6): p. 725-31.
25. Boatright, K.M., et al., A unified model for apical Caspase activation. *Mol Cell*, 2003. 11(2): p. 529-41.
26. Chao, Y., et al., Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for Caspase activation. *PLoS Biol*, 2005. 3(6): p. e183.
27. Stennicke, H.R., et al., caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*, 1999. 274(13): p. 8359-62.
28. Brady, S.C., L.A. Allan, and P.R. Clarke, Regulation of caspase-9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(23): p. 10543-55.
29. Martin, M.C., et al., Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J Biol Chem*, 2005. 280(15): p. 15449-55.
30. Cardone, M.H., et al., Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 1998. 282(5392): p. 1318-21.
31. Raina, D., et al., c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2005. 280(12): p. 11147-51.
32. Papworth, C., Bauer, J. C., Braman, J. and Wright, D. A., Site-directed mutagenesis in one day with >80 % efficiency. *Strategies*, 1996. 9(3): p. 3-4.
33. Spencer, D.M., et al., Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol*, 1996. 6(7): p. 839-47.
34. Hsiao, E.C., et al., Constitutive Gs activation using a single-construct tetracycline-inducible expression system in embryonic stem cells and mice. *Stem Cell Res Ther*, 2011. 2(2): p. 11.
35. Waldner, C., et al., Double conditional human embryonic kidney cell line based on FLP and PhiC31 mediated transgene integration. *BMC Res Notes*, 2011. 4: p. 420.

65

Ejemplo 3: Secuencias adicionales

SEQ ID NO: 74 Secuencia de nucleótidos Casp 9 (truncada)

GGATTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTGGCTTACATCC
TGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACCTCTGCCGTGAGT
CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTC
TCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTG
GCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCAT
TCTCTCACGGCTGTGAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGA
TGGATGCCCTGTGTCGGTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAG
CCTGGGAGGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGAGCAGAAAGACC
ATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCCGAGC
CAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTA
GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGG
AGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTG
GGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAA
AGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTCCTCCGAAAAAACTTTTCTTAAAA
CATCA

5

SEQ ID NO: 75, secuencia de aminoácidos de caspasa-9 (truncada) - dominio CARD suprimido

G F G D V G A L E S L R G N A D L A Y I L S M E P C G H C L I I N N V
N F C R E S G L R T R T G S N I D C E K L R R R F S S L H F M V E V K
G D L T A K K M V L A L L E L A Q Q D H G A L D C C V V V I L S H G C
Q A S H L Q F P G A V Y G T D G C P V S V E K I V N I F N G T S C P S
L G G K P K L F F I Q A C G G E Q K D H G F E V A S T S P E D E S P
G S N P E P D A T P F Q E G L R T F D Q L D A I S S L P T P S D I F V
S Y S T F P G F V S W R D P K S G S W Y V E T L D D I F E Q W A H S
E D L Q S L L L R V A N A V S V K G I Y K Q M P G C F N F L R K K L F
F K T S

10

SEQ ID NO: 76, secuencia de nucleótidos FKBPv36 (Fv1)

GGCGTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTTCCCCAAACGAGGCCAA
ACATGCGTAGTTTCATTATACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAGTAGATAGTAGAG
ACCGAAACAACCATTTAAATTTATGTTGGGAAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGA
AGGTGTAGCACAAATGTCTGTTGGCCAGCGCGCAAACTCACAATTTCTCCTGATTATGCT
TACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCATCATACCCCTCATGCCACACTGGTGTGACGTC
GAATTGCTCAAACCTGGAA

15

SEQ ID NO: 77, secuencia de aminoácidos FKBPv36 (Fv1)

GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVWHYTGMLDGGKVDSSDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKE

SEQ ID NO: 78, secuencia de nucleótidos FKBPv36 (Fv2)

GGaGTgCAgGTgGAgACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaACcTTtCCaAAgCGcGGtCAgACcTgTg
TtGTcCAcTAcACcGGtATGCTgGAgGAcGGgAAgAAgGTgGActTtcacGcGAtCGcAAAtAAgCCtT
TcAAgTTcATGcTcGGcAAgCAGAgGTgATccGGGGgTGGGAgGAgGGcGTgGCtCAGATGTCg
GTcGGgCAaCGaGCgAAgCTtACcATcTcACcGAcTAcGCgTAtGGgGCaACgGGgCAcCCgGG
aATtATcCCtCCcACgCtACgCTcGTaTTcGAtGTgGAgcTcttgAAgCTtGag

20

SEQ ID NO: 79, secuencia de aminoácidos FKBPv36 (Fv2)

GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

SEQ ID NO: 80: Secuencia de nucleótidos optimizada con codón T2A
GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATGTGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGACCA

SEQ ID NO: 81: Secuencia de aminoácidos optimizada con codón T2A
EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO: 82, virus-2A de Thesea asigna de la secuencia de nucleótidos del precursor de la proteína de la cápside
GCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCC

SEQ ID NO: 83, virus-2A de Thesea asigna de la secuencia de aminoácidos del precursor de la proteína de la cápside
A E G R G S L L T C G D V E E N P G P

SEQ ID NO: 84: Secuencia de aminoácidos de FKBP (con fenilalanina en la posición 36)

GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDRNKPFFMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

La mención de las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones y documentos anteriores no es una admisión de que cualquiera de los anteriores sea una técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión en cuanto al contenido o la fecha de estas publicaciones o documentos. Su mención no es una indicación de una búsqueda de divulgaciones relevantes. Todas las declaraciones con respecto a la(s) fecha(s) o contenido de los documentos se basan en la información disponible y no es una admisión en cuanto a su precisión o exactitud.

La tecnología ilustrativamente descrita en el presente documento puede practicarse adecuadamente en ausencia de cualesquier elemento(s) no divulgado(s) específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso del presente documento, cualquiera de los términos “que comprende”, “que consiste esencialmente en” y “que consiste en” se puede sustituir por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación.

El término “un” o “una” se puede referir a uno o una pluralidad de elementos que modifica (por ejemplo, “un reactivo” puede significar uno o más reactivos) a menos que sea contextualmente claro se describe uno de los elementos o más de uno de los elementos. El término “aproximadamente” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos el 10 %) y el uso del término “aproximadamente” al comienzo de una cadena de valores modifica cada uno de los valores (es decir, “aproximadamente 1, 2 y 3” se refiere a aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3). Por ejemplo, un peso de “aproximadamente 100 gramos” puede incluir pesos entre 90 gramos y 110 gramos. Además, cuando se describe una lista de valores en el presente documento (por ejemplo, aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 % u 86 %), el listado incluye todos los valores intermedios y fraccionarios de los mismos (por ejemplo, 54 %, 85.4 %) Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente tecnología ha sido específicamente divulgada por realizaciones representativas y características opcionales, aquellos expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos en el presente documento divulgados, y dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta tecnología.

Ciertas realizaciones de la tecnología se exponen en la(s) reivindicación(es) que sigue(n).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica CDR3, en la que el polinucleótido que codifica CDR3 codifica la región CDR3 de un receptor de células T que se une específicamente al antígeno expresado preferencialmente en melanoma (PRAME), en la que:
 - a) el polinucleótido que codifica CDR3 comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende las regiones VJ de un polipéptido TCR α , en el que el primer polipéptido comprende la región CDR3 del polipéptido TCR α , y en el que la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; y
 - b) el polinucleótido que codifica CDR3 comprende un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende las regiones VDJ de un polipéptido TCR β , en el que el segundo polipéptido comprende la región CDR3 del polipéptido TCR β , y en el que la región CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;
 en el que la región CDR3 del polipéptido TCR α y la región CDR3 del polipéptido TCR β juntas se unen específicamente a PRAME.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la molécula de ácido nucleico codifica un receptor de células T, y en la que las regiones CDR3 del receptor de células T se unen específicamente a un polipéptido PRAME que comprende la secuencia de aminoácidos SLLQHLIGL.
4. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que
 - a) el primer polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:33; y
 - b) el segundo polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:35 o SEQ ID NO: 36.
5. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la región CDR3 del receptor de células T se une específicamente a un complejo péptido-MHC, en el que la molécula MHC es una molécula HLA Clase I MHC y el péptido es un epítipo PRAME.
6. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un promotor ligado operativamente al polinucleótido que codifica CDR3.
7. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la molécula de ácido nucleico comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido Caspasa-9 quimérico que comprende una región de unión a ligando multimérico y un polipéptido Caspasa-9.
8. Vector de plásmido o vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Una célula modificada transfectada o transducida con una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Una célula modificada transfectada o transducida con una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de células T que se une específicamente al antígeno expresado preferencialmente en melanoma (PRAME), en el que la molécula de ácido nucleico comprende un primer polinucleótido que codifica un primer polipéptido que comprende las regiones VJ de un polipéptido TCR α , en el que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo polipéptido que comprende las regiones VDJ de un polipéptido TCR β , en el que el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.
11. La célula modificada de la reivindicación 10, en la que el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 y el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.
12. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un vector de la reivindicación 8 o una célula modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 para uso en la potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto diagnosticado con una enfermedad o afección hiperproliferativa, en la que se va a administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica al sujeto.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 para uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por células a una población de células diana o tejido en un sujeto, en la que se va a administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica al sujeto.
- 5 15. Un método in vitro para expresar un receptor de células T que se une específicamente a PRAME en una célula, que comprende poner en contacto una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con una célula bajo condiciones en las que el ácido nucleico se incorpora a la célula, por lo que la célula expresa el receptor de células T del ácido nucleico incorporado.

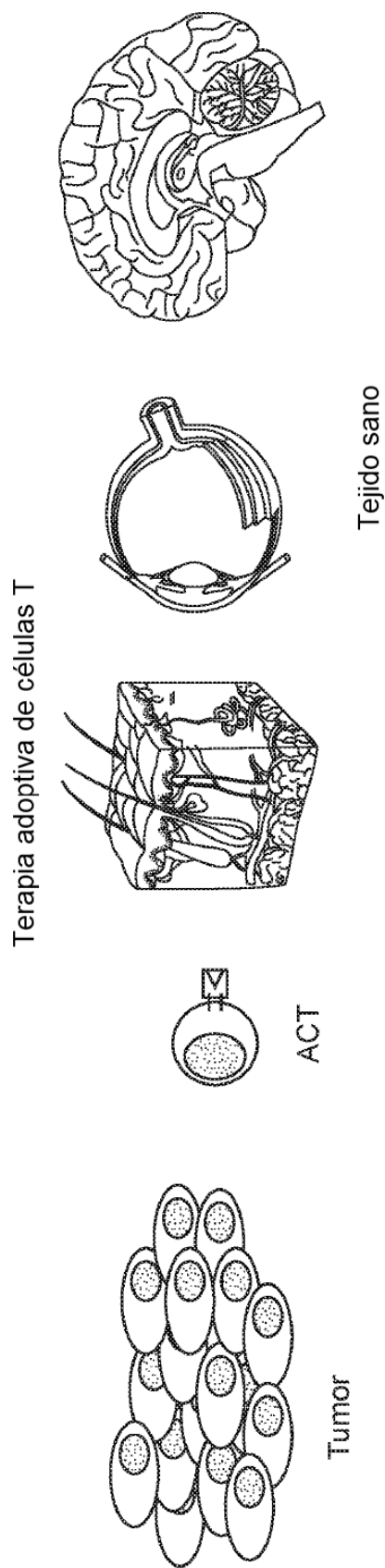


FIG. 1A

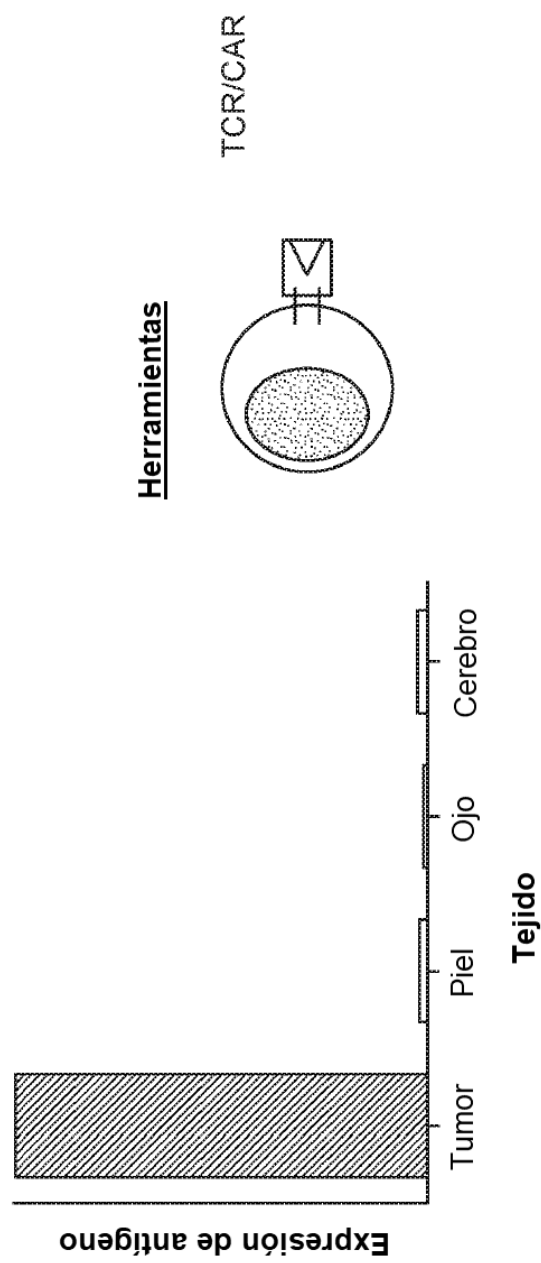
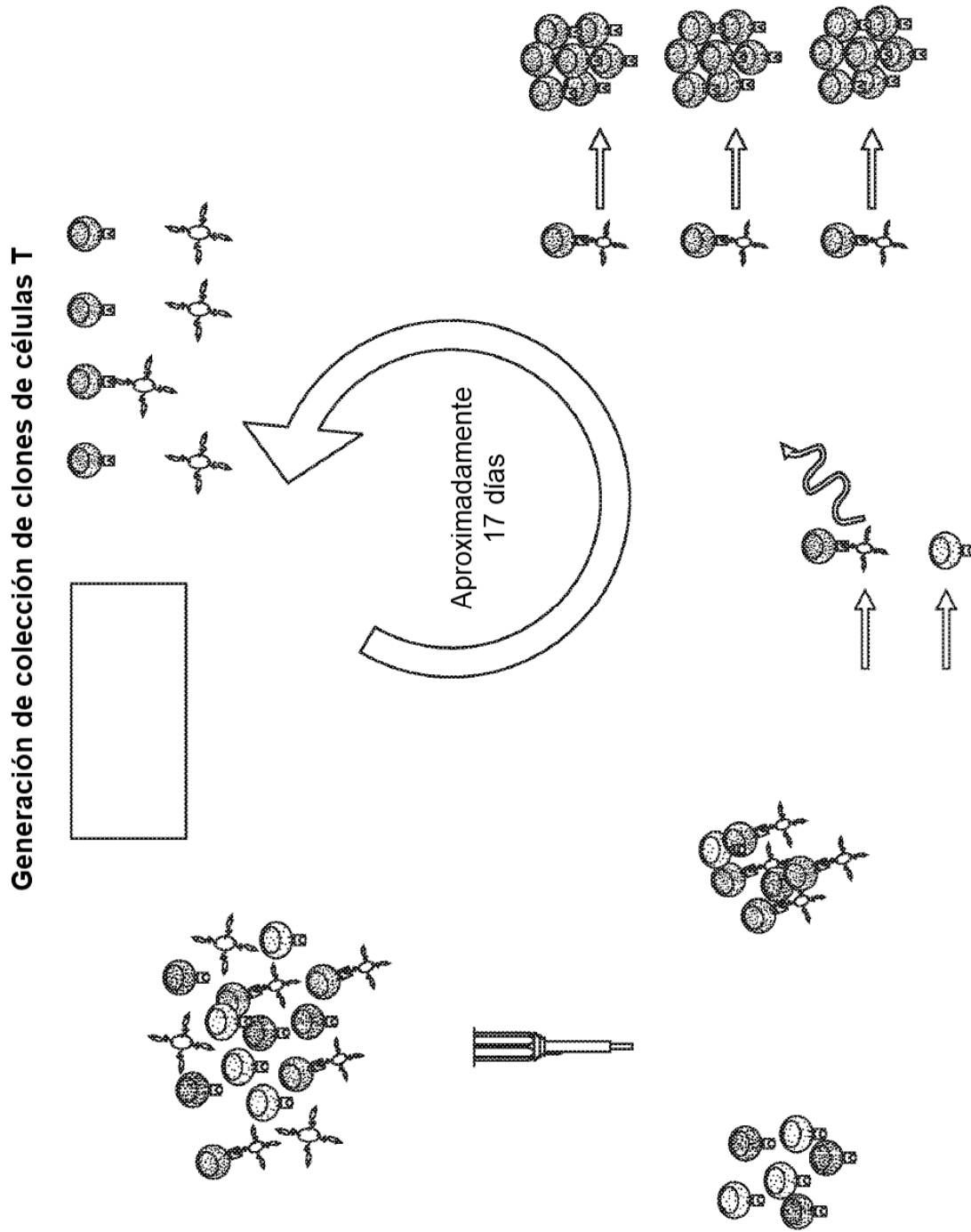


FIG. 1B



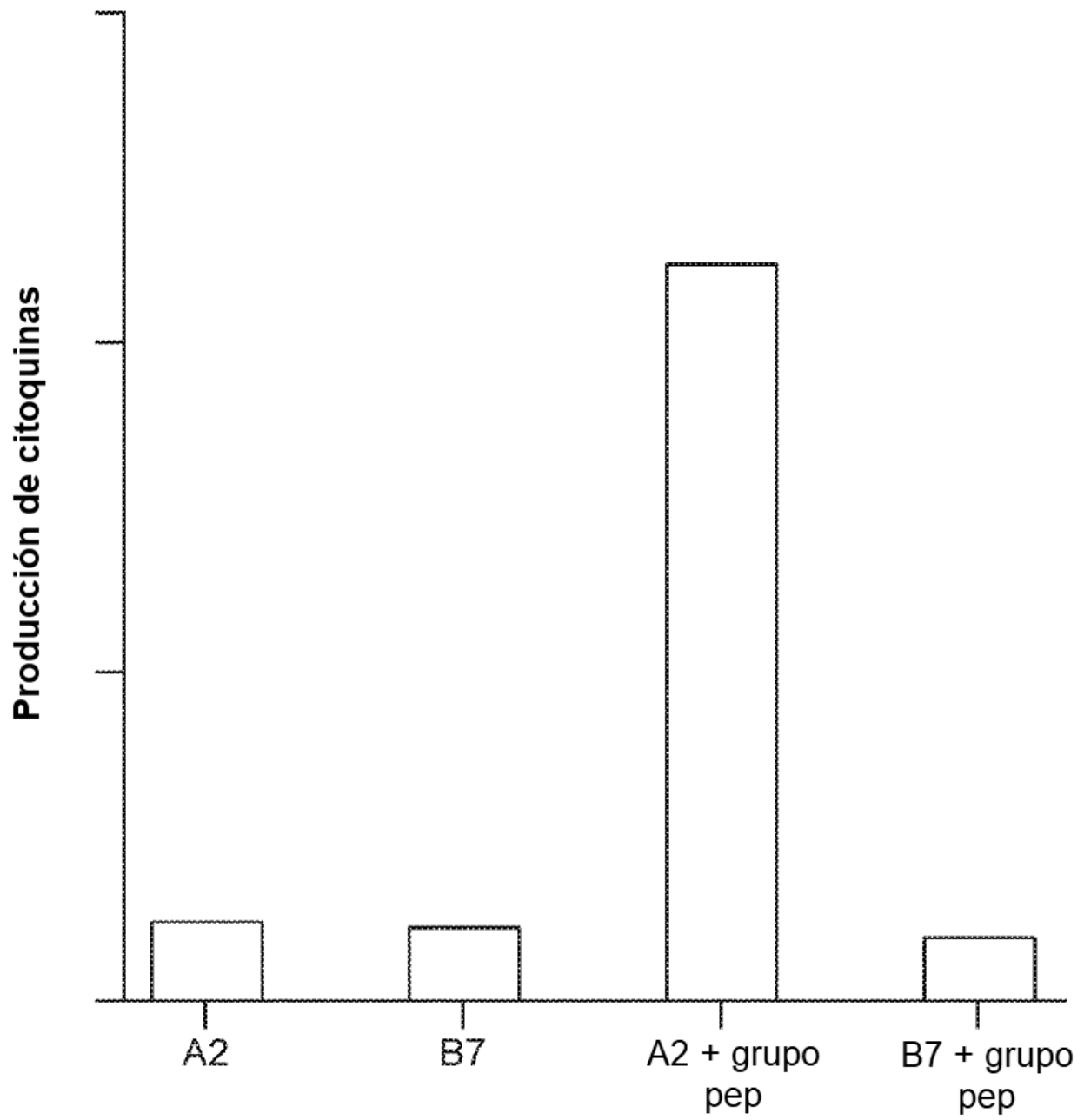


FIG. 2B

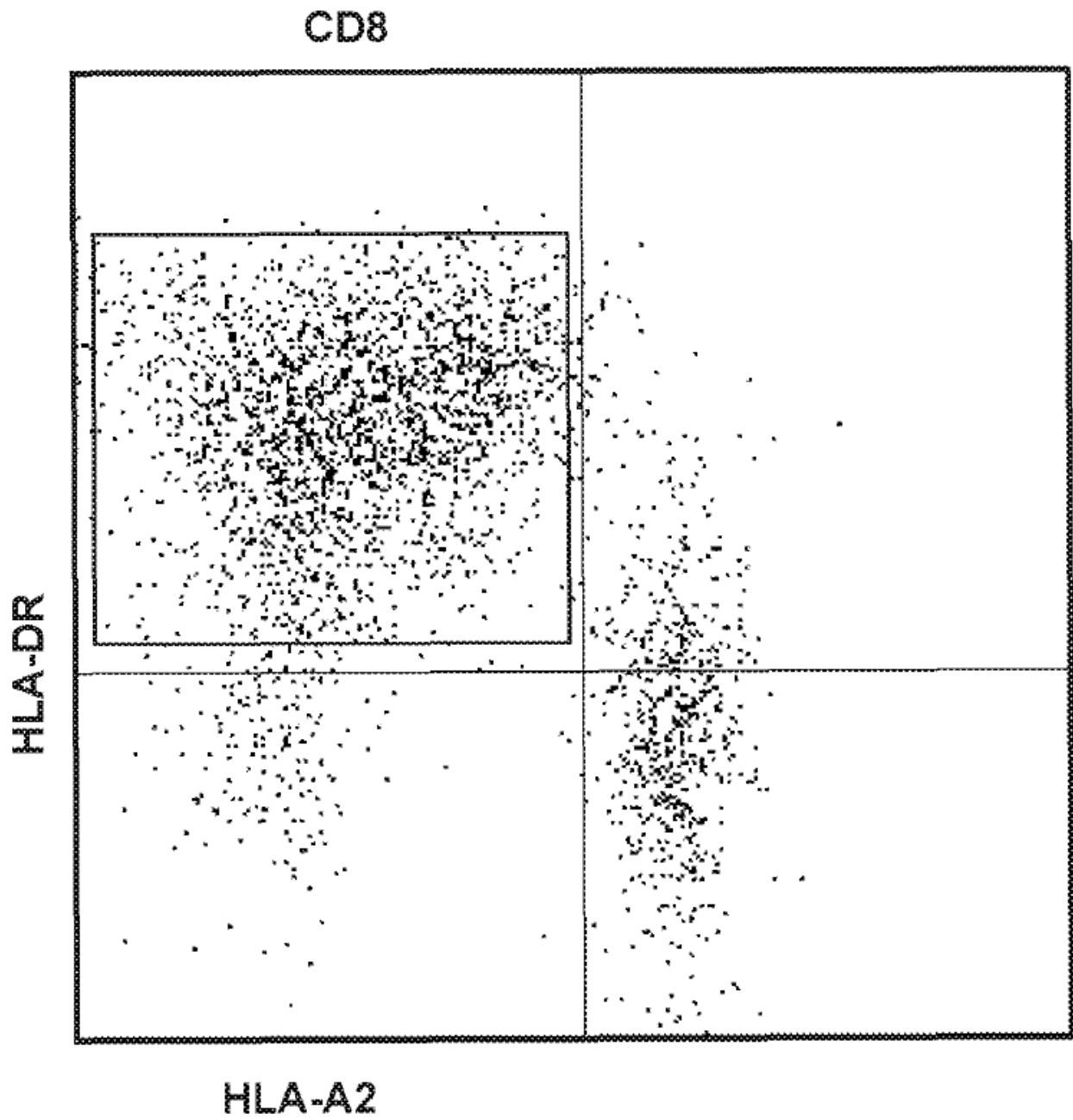


FIG. 3

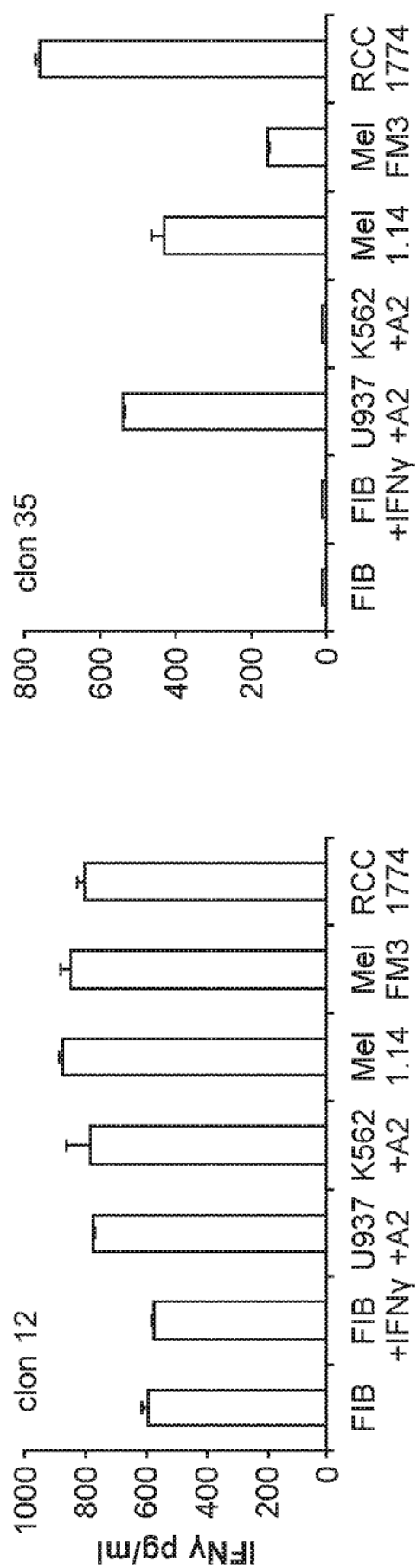
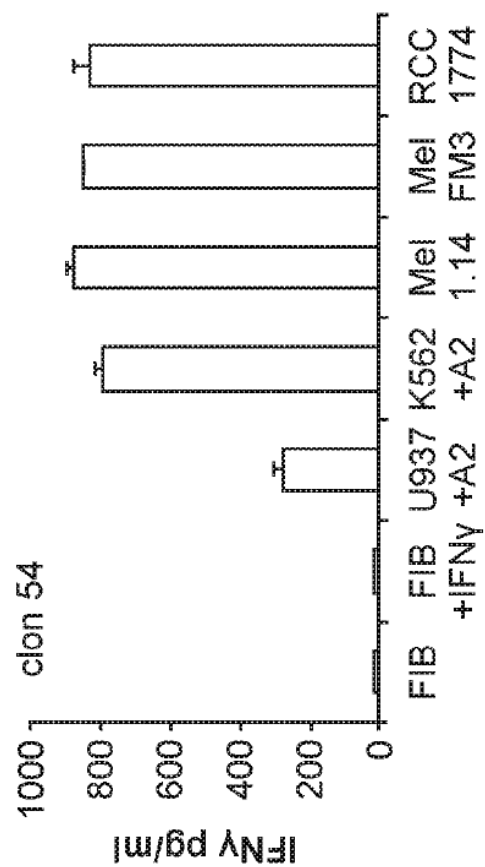
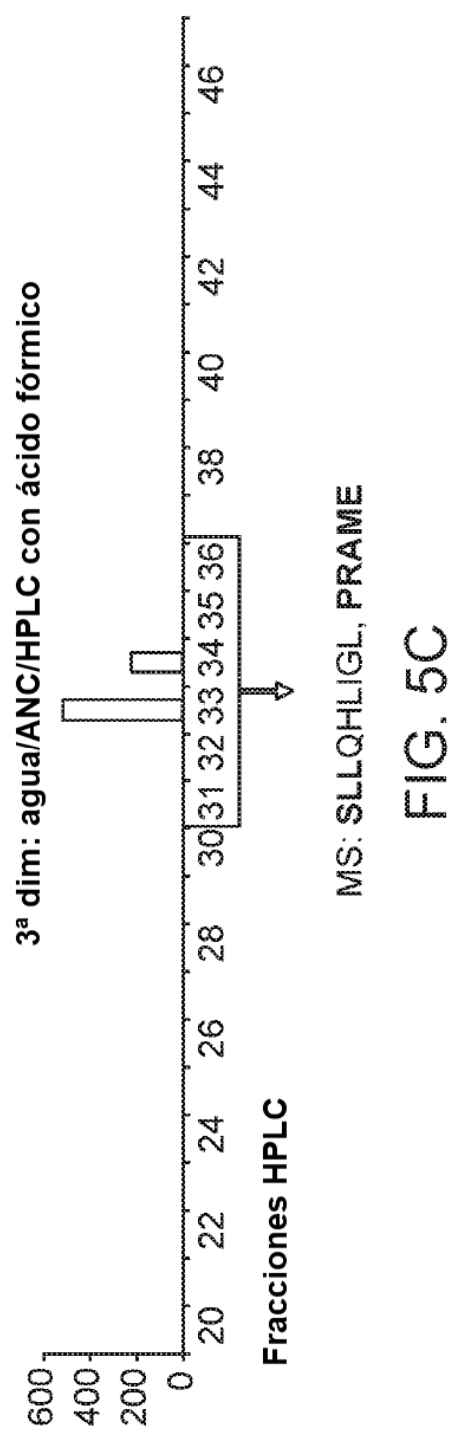
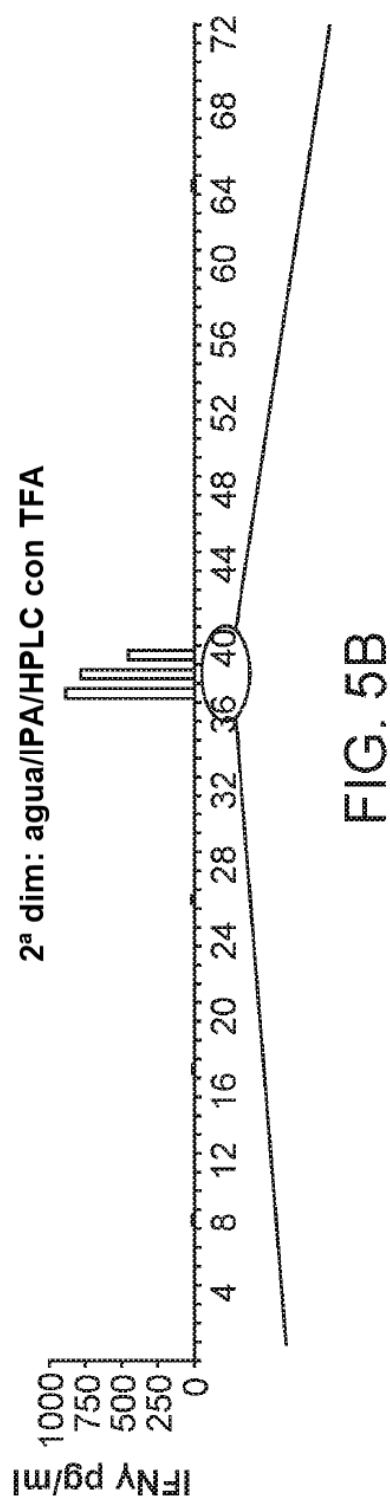
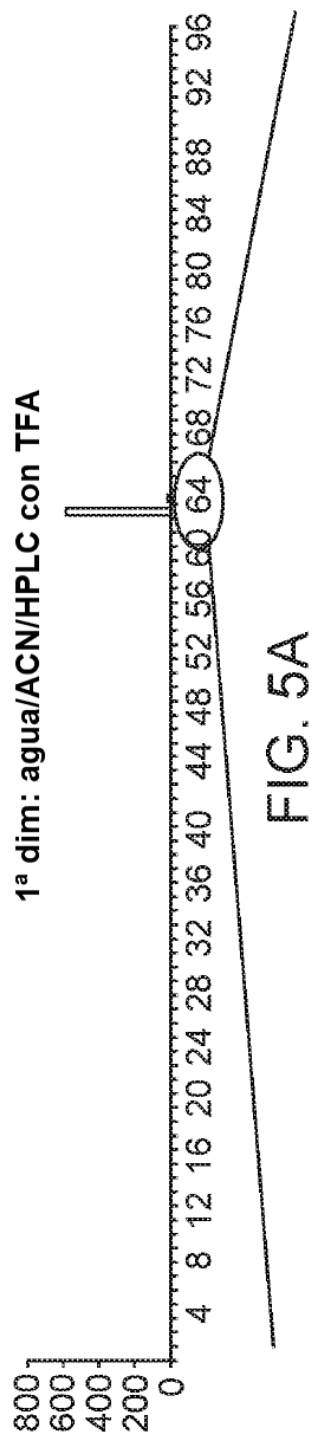


FIG. 4B





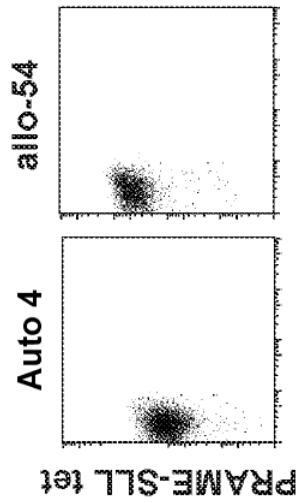


FIG. 6A

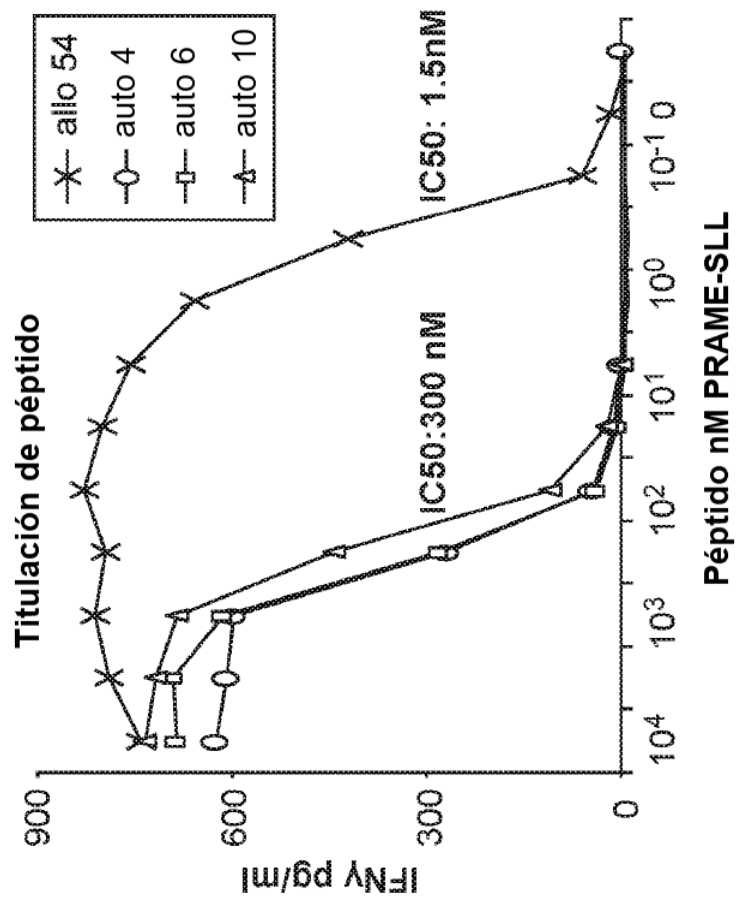


FIG. 6B

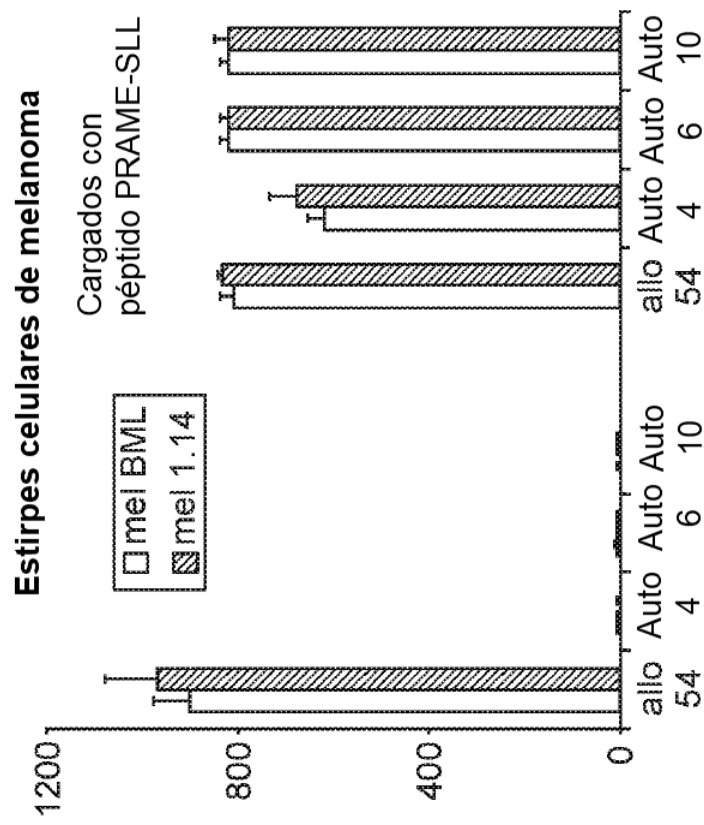


FIG. 6C

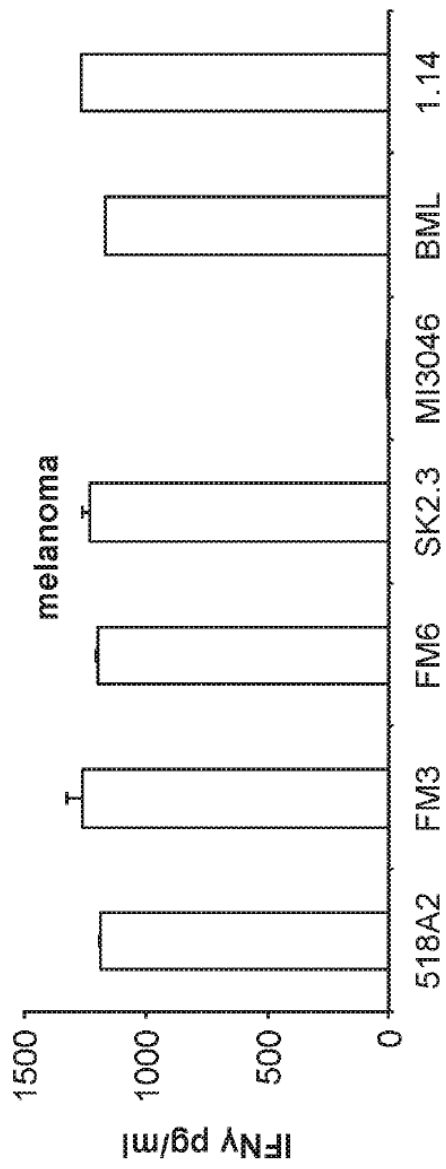


FIG. 7A

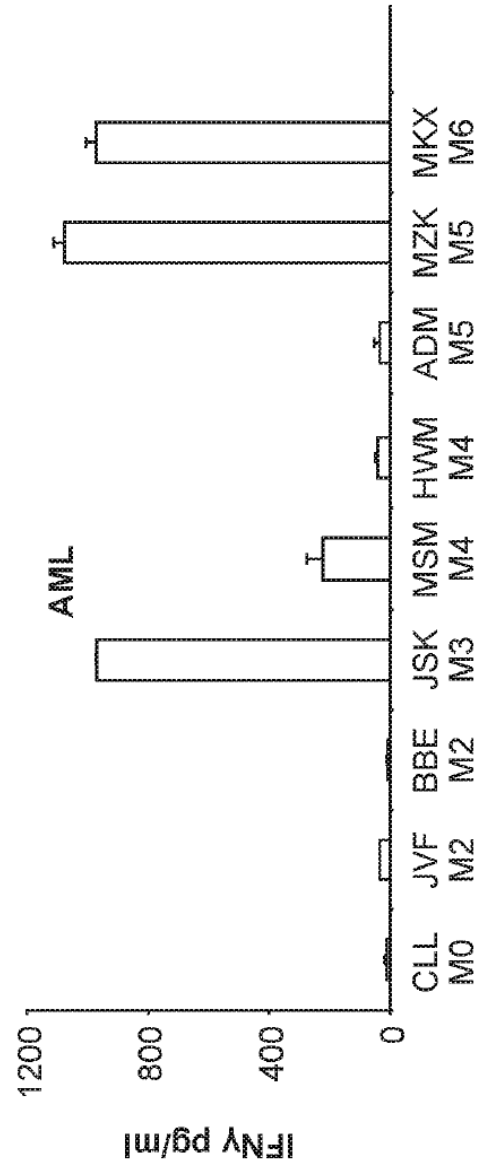


FIG. 7B

El clon PRAME reactivo
contra:

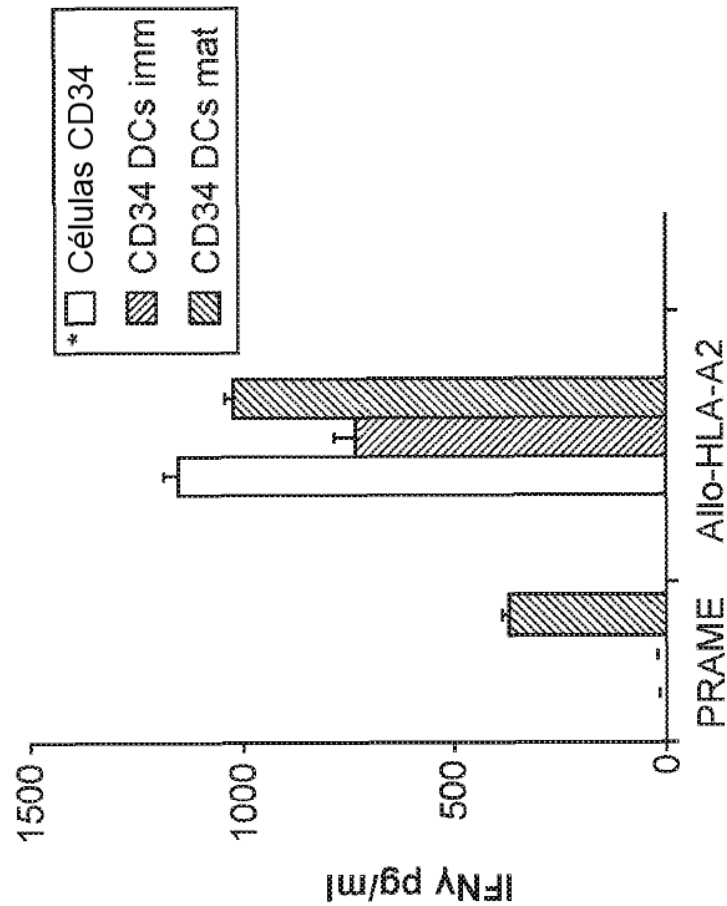
- melanoma 6/7
- carcinoma de células renales 2/3
- carcinoma de pulmón 1/2
- carcinoma de mama 1/3
- carcinoma de colon 2/4
- carcinoma de cervix 1/3
- AML 3/9

El clon PRAME no demostró reactividad contra:

- Fibroblastos +/-IFN γ
- Queratinocitos +/-IFN γ
- Células epiteliales de los bronquios
- Células epiteliales biliares
- Células epiteliales de colon
- Hepatocitos
- Células estromales mesenquimatosas
- Células B (activadas)
- Monocitos
- Células CD34
- Progenie de células CD34
- Células T

Baja reactividad contra células epiteliales tubulares de riñón

Reactividad intermedia contra DC maduro



*Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a barras dentro de cada agrupación en la gráfica (izquierda a derecha)

FIG. 8

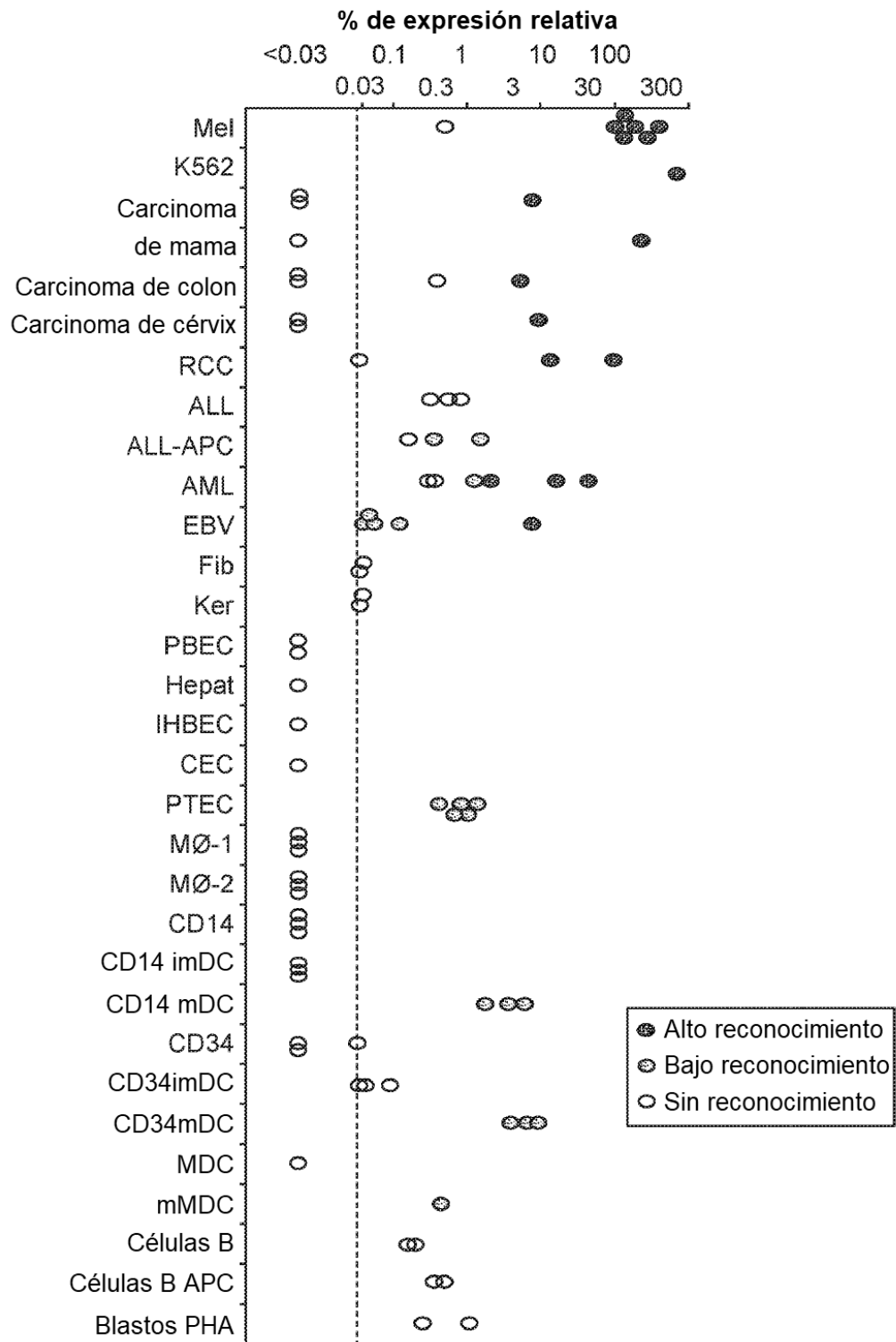


FIG. 9

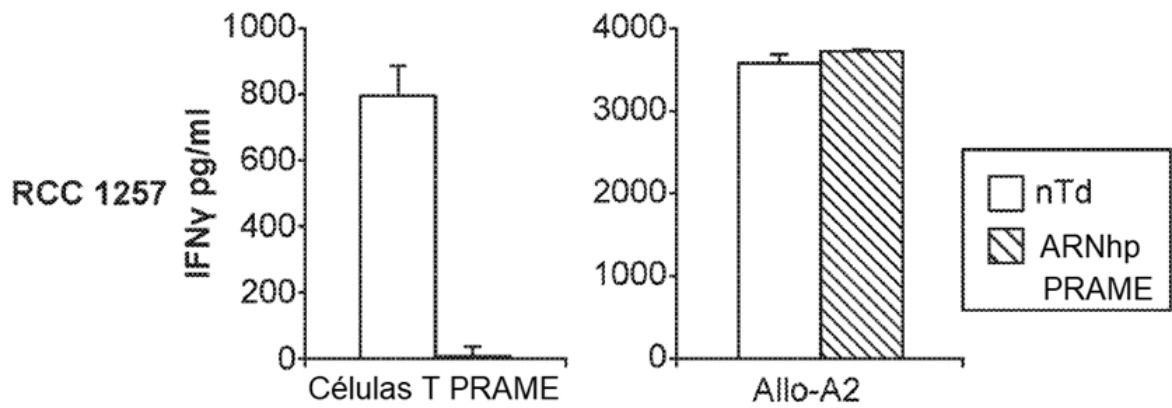


FIG. 10A

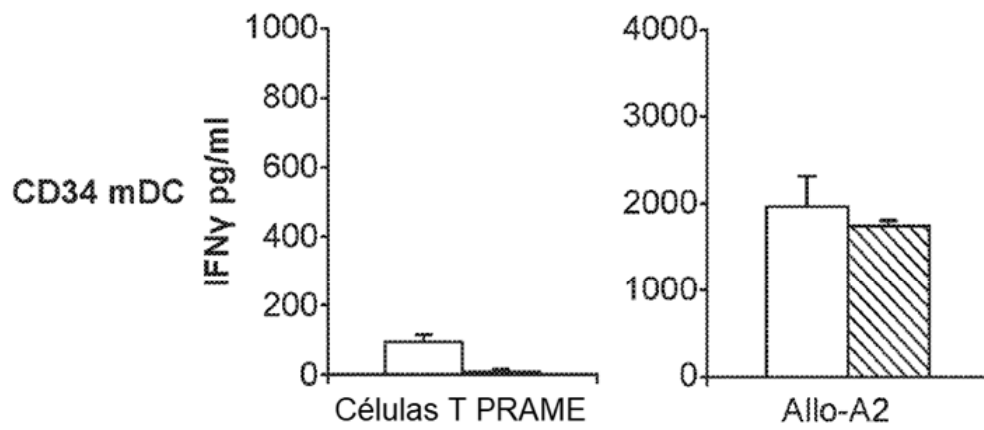


FIG. 10B

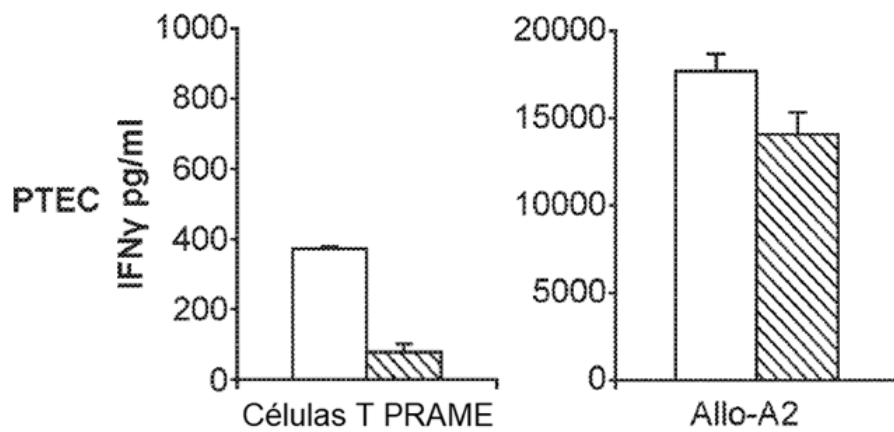
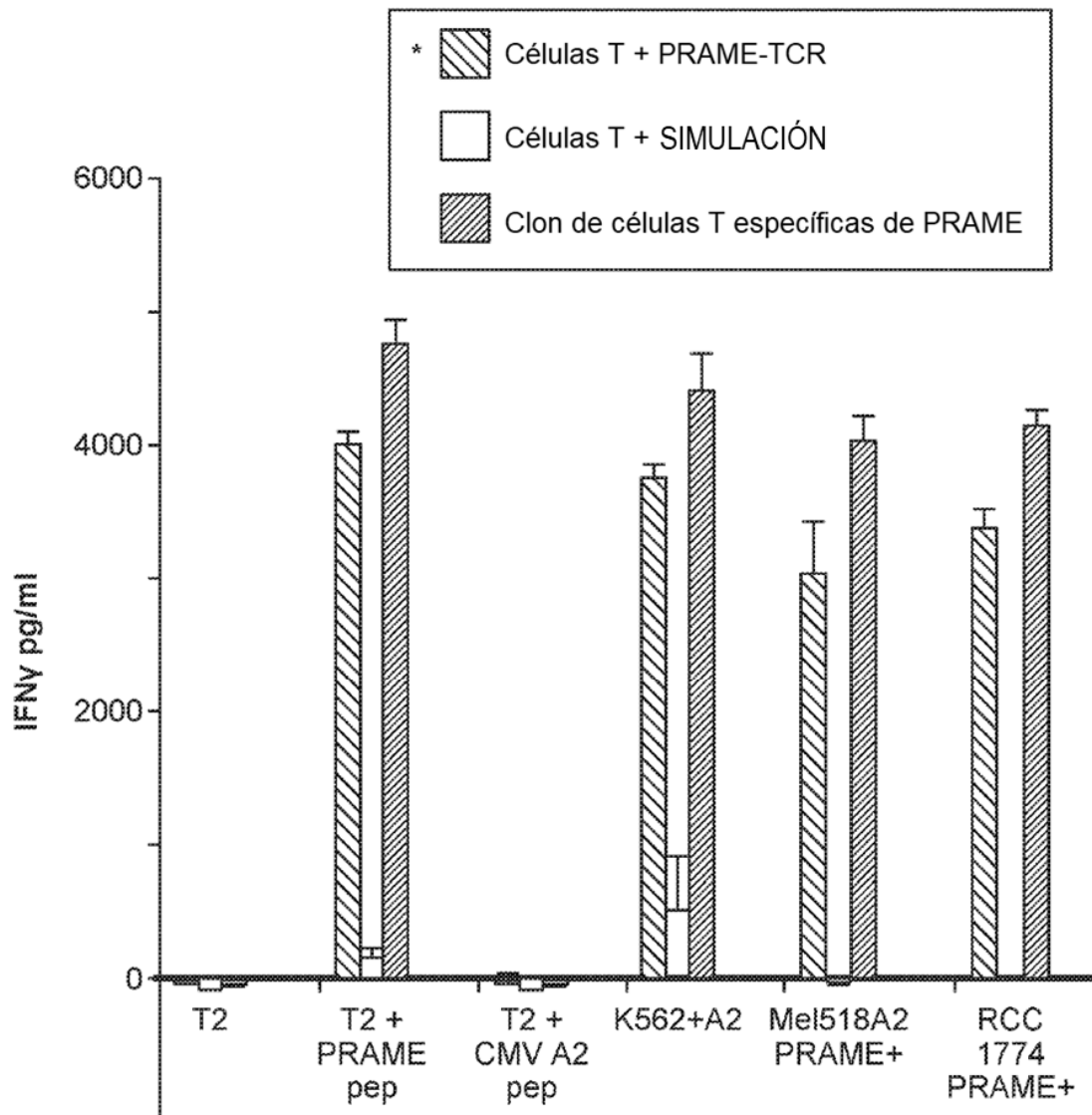
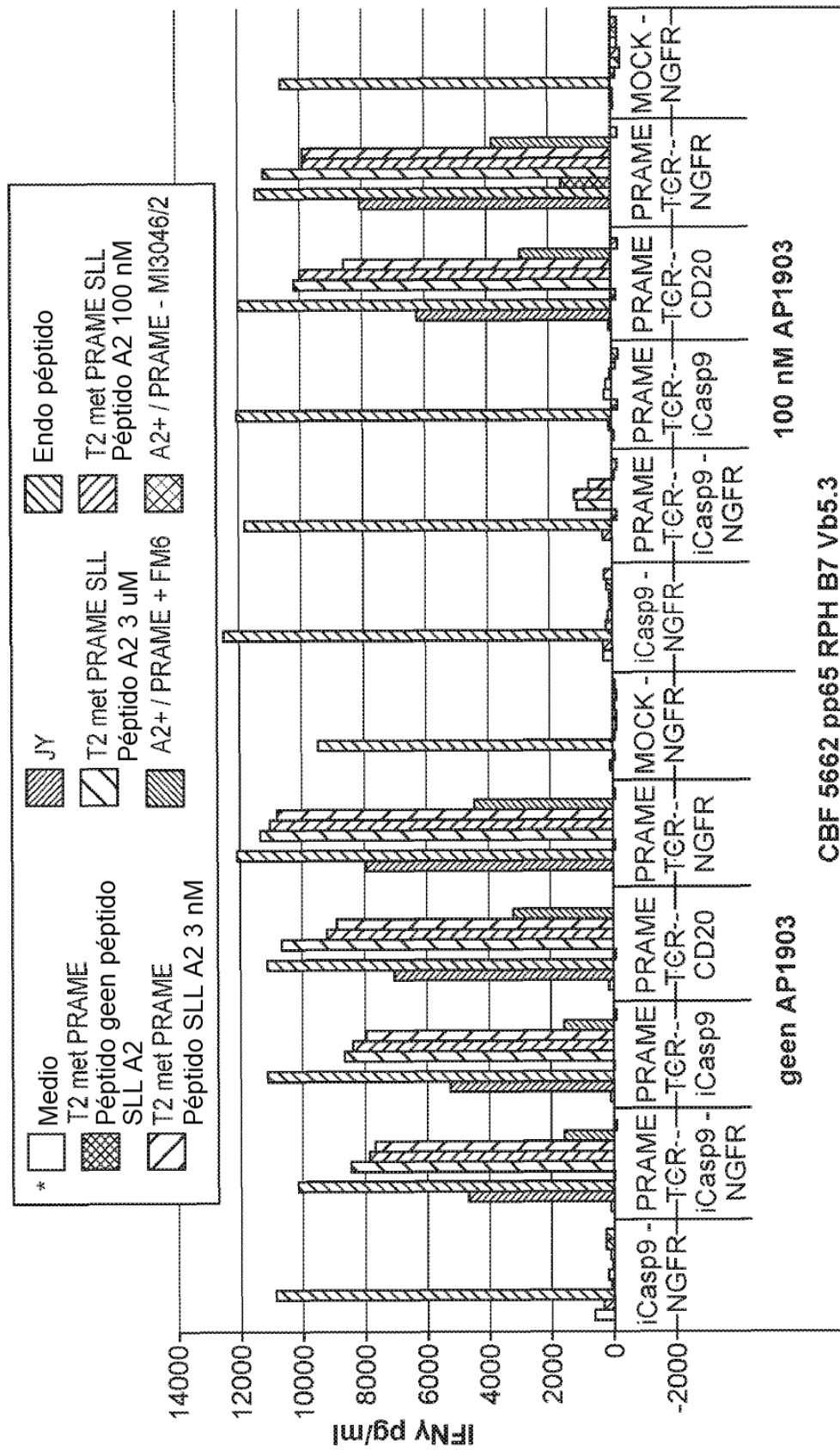


FIG. 10C



* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)

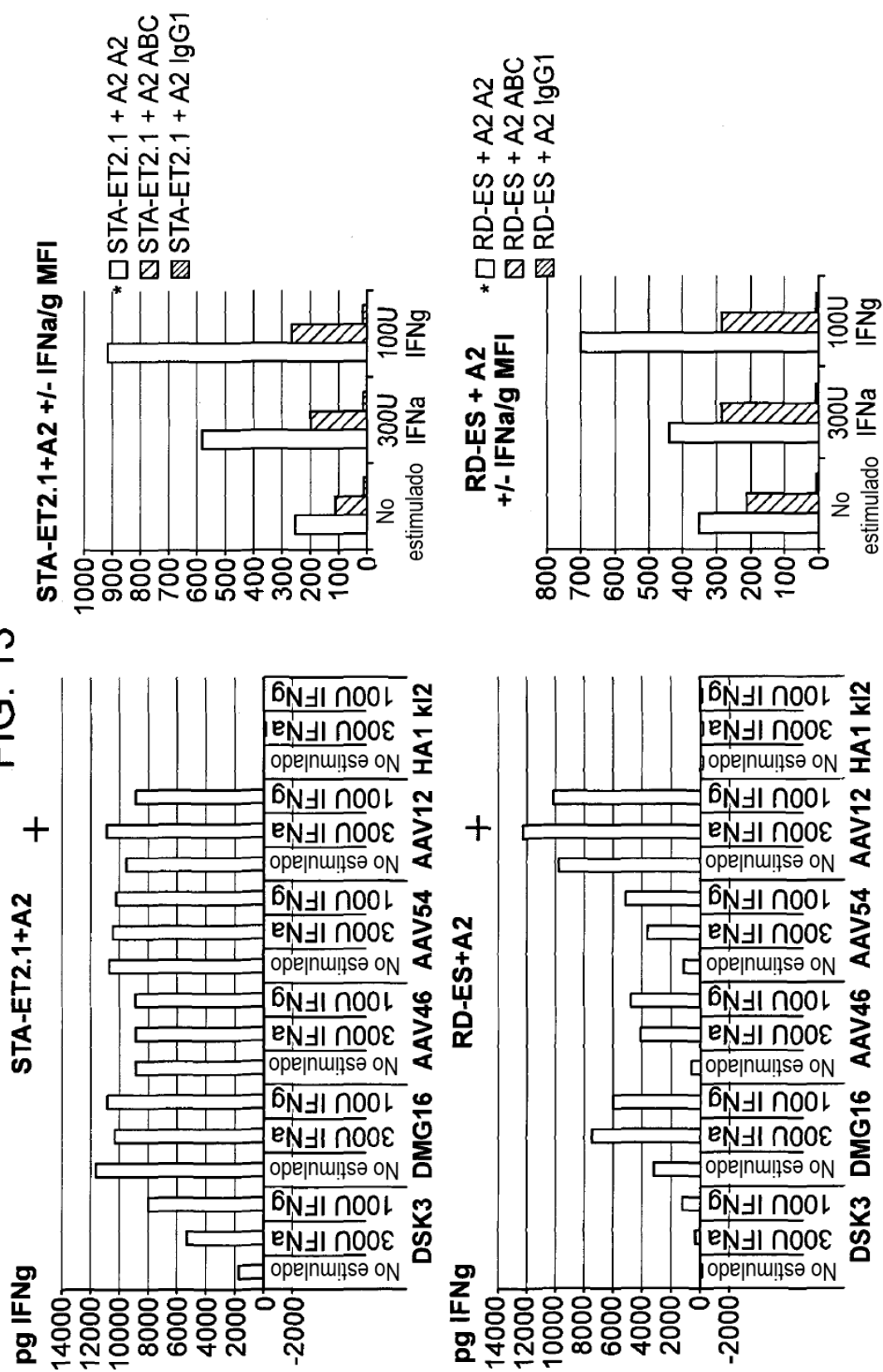
FIG. 11



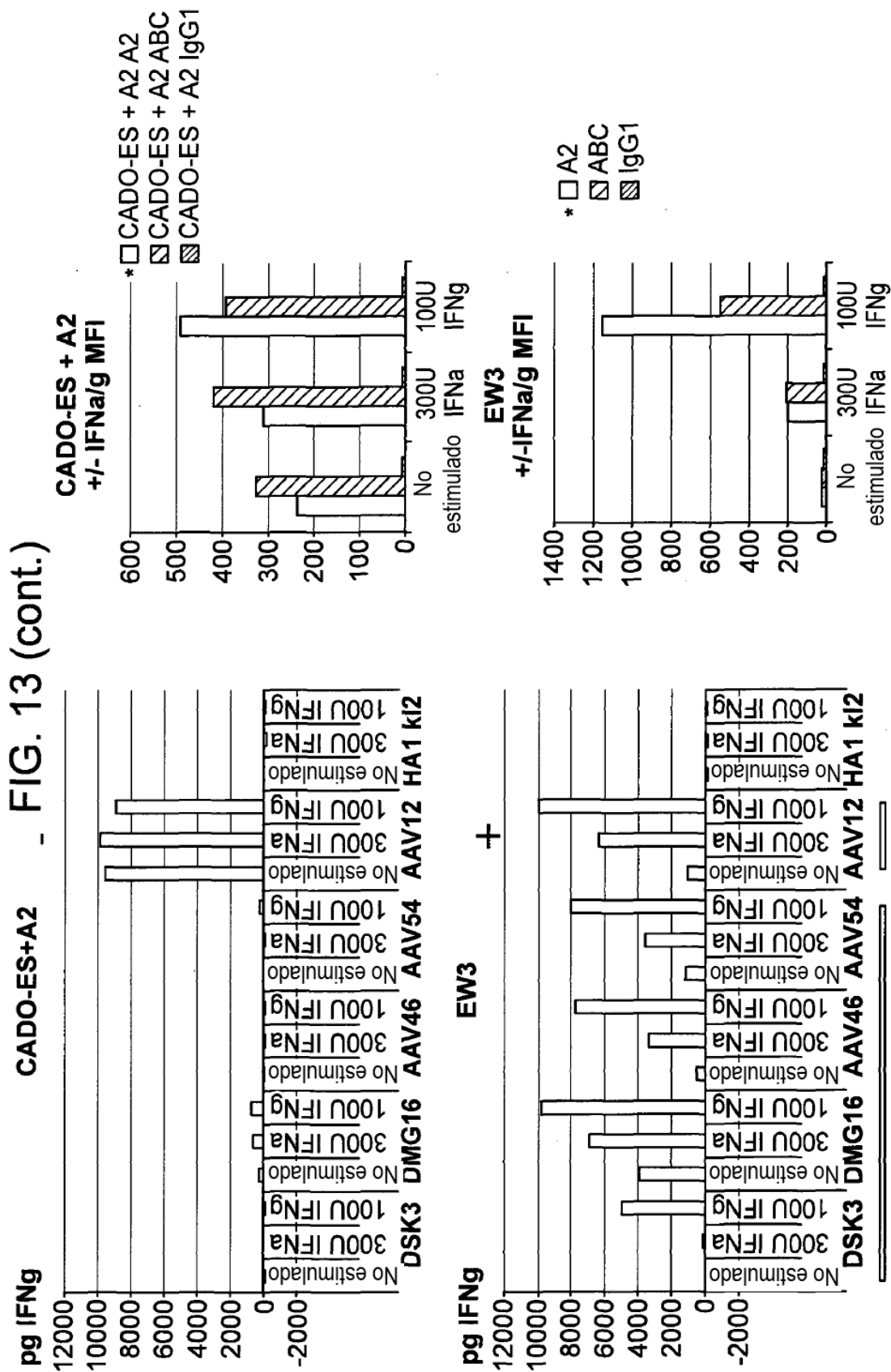
* Las etiquetas de leyenda de las figuras (izquierda a derecha) corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)

FIG. 12

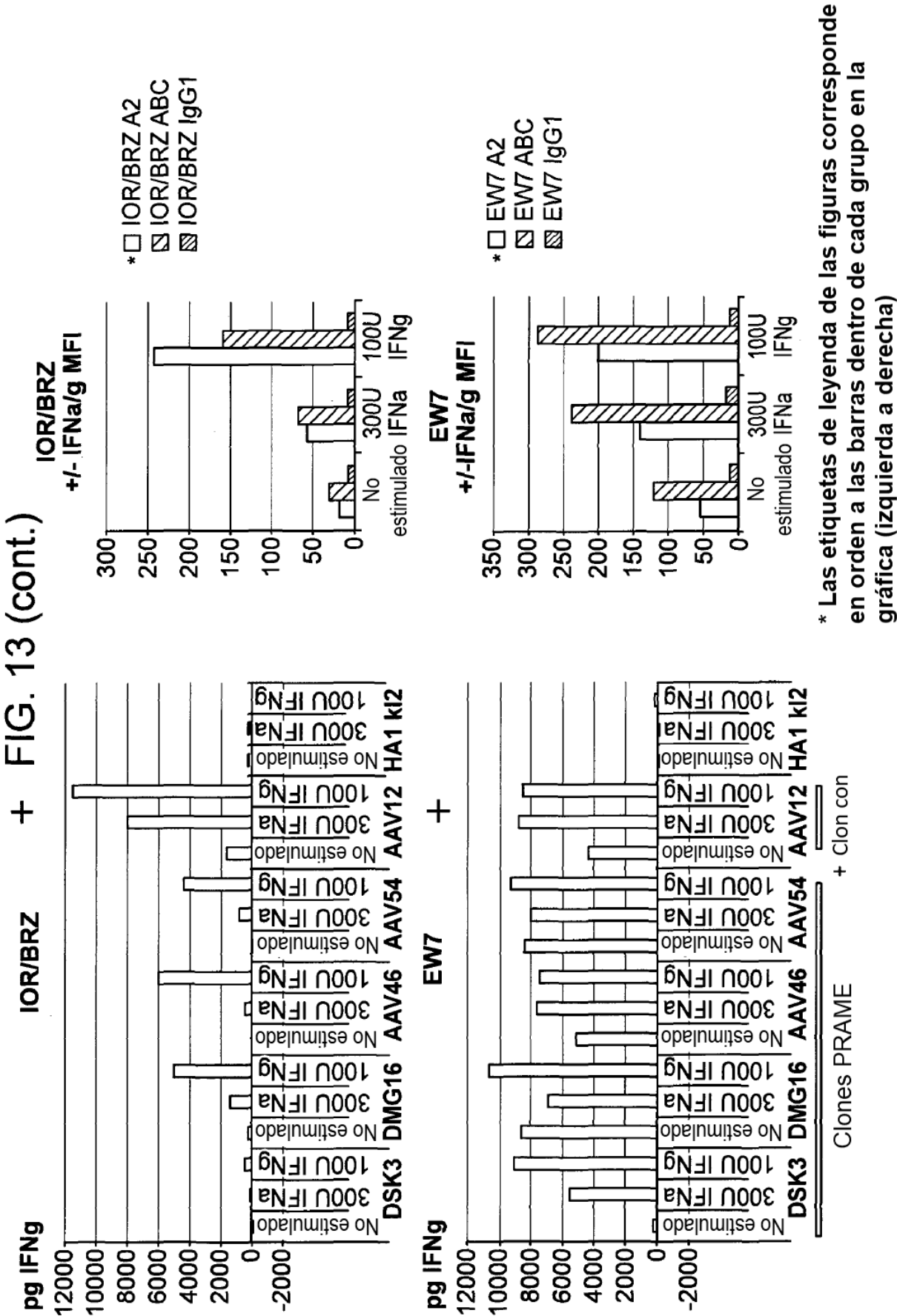
FIG. 13



* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)



* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)



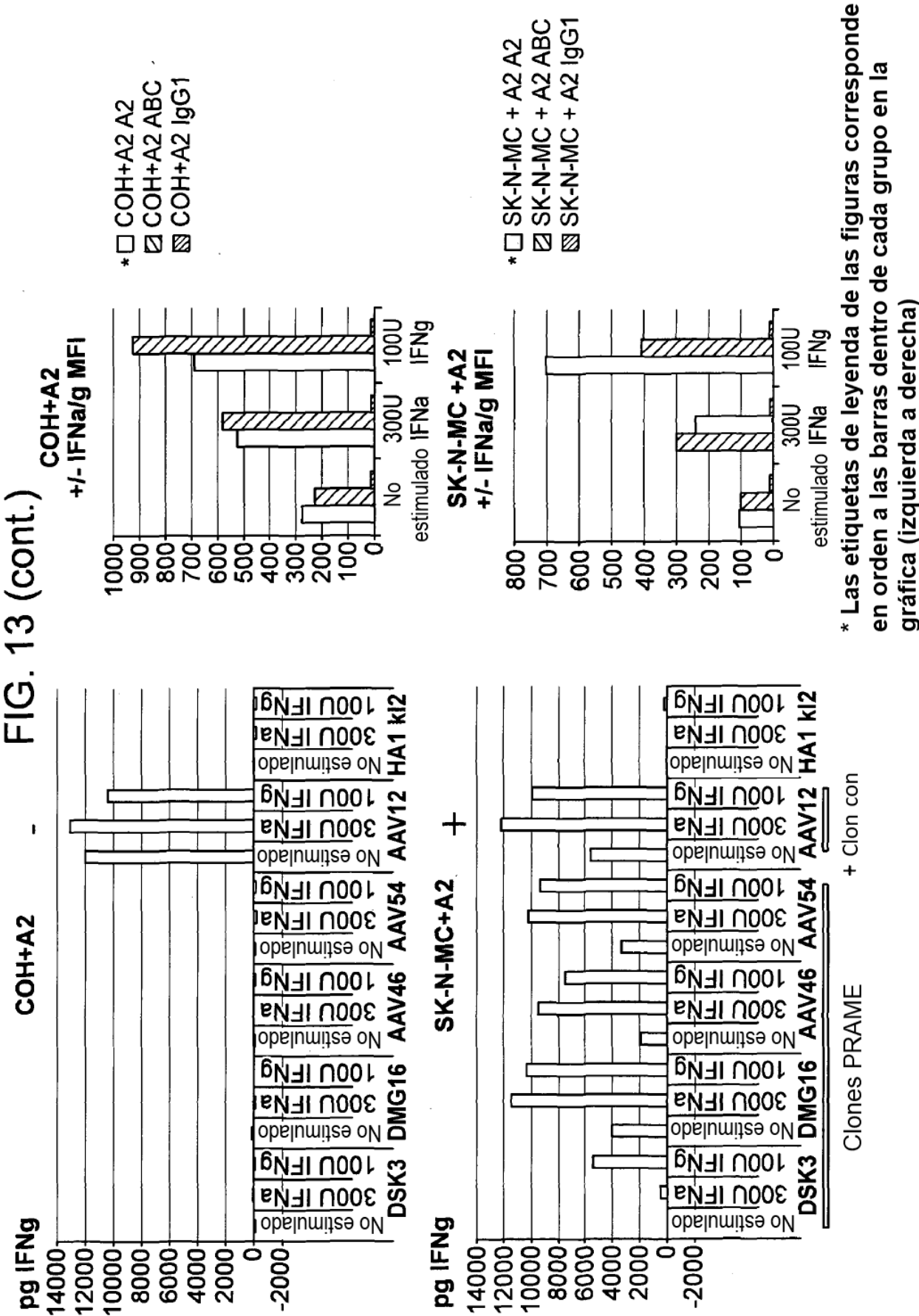
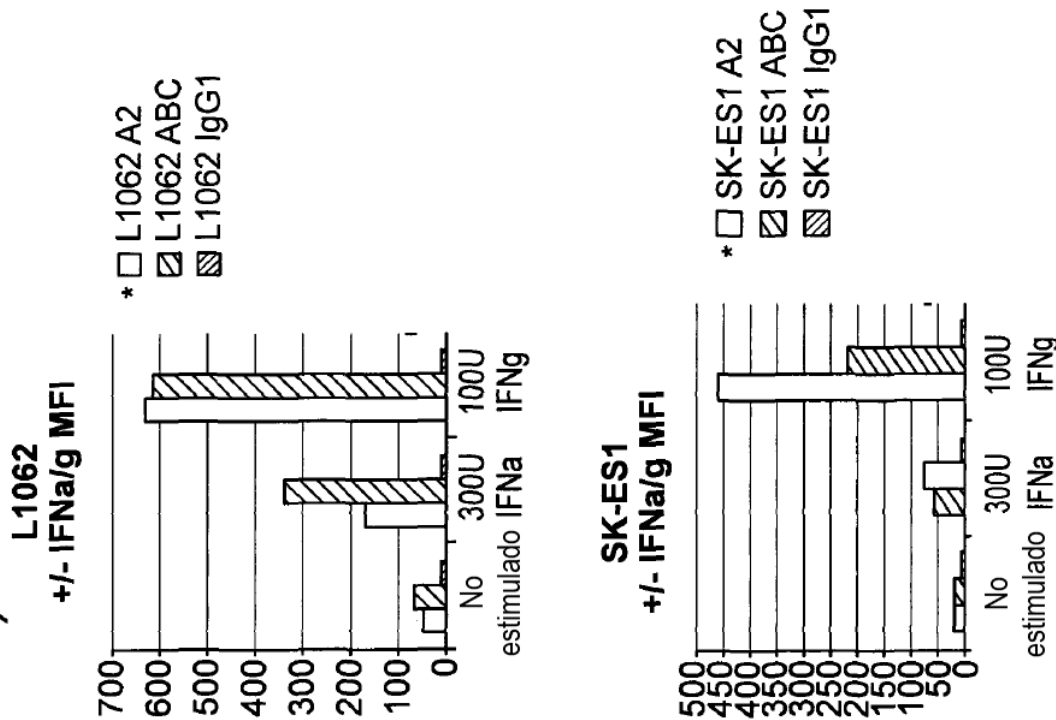
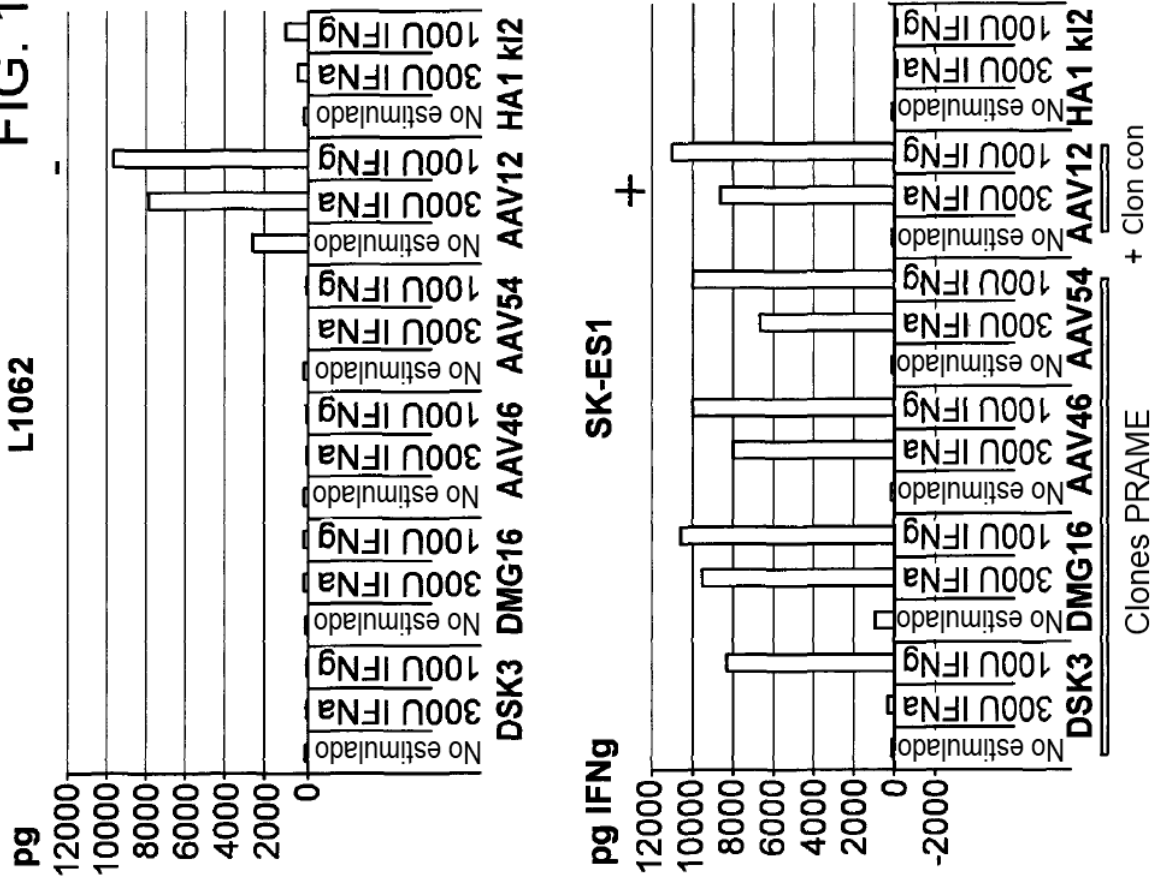
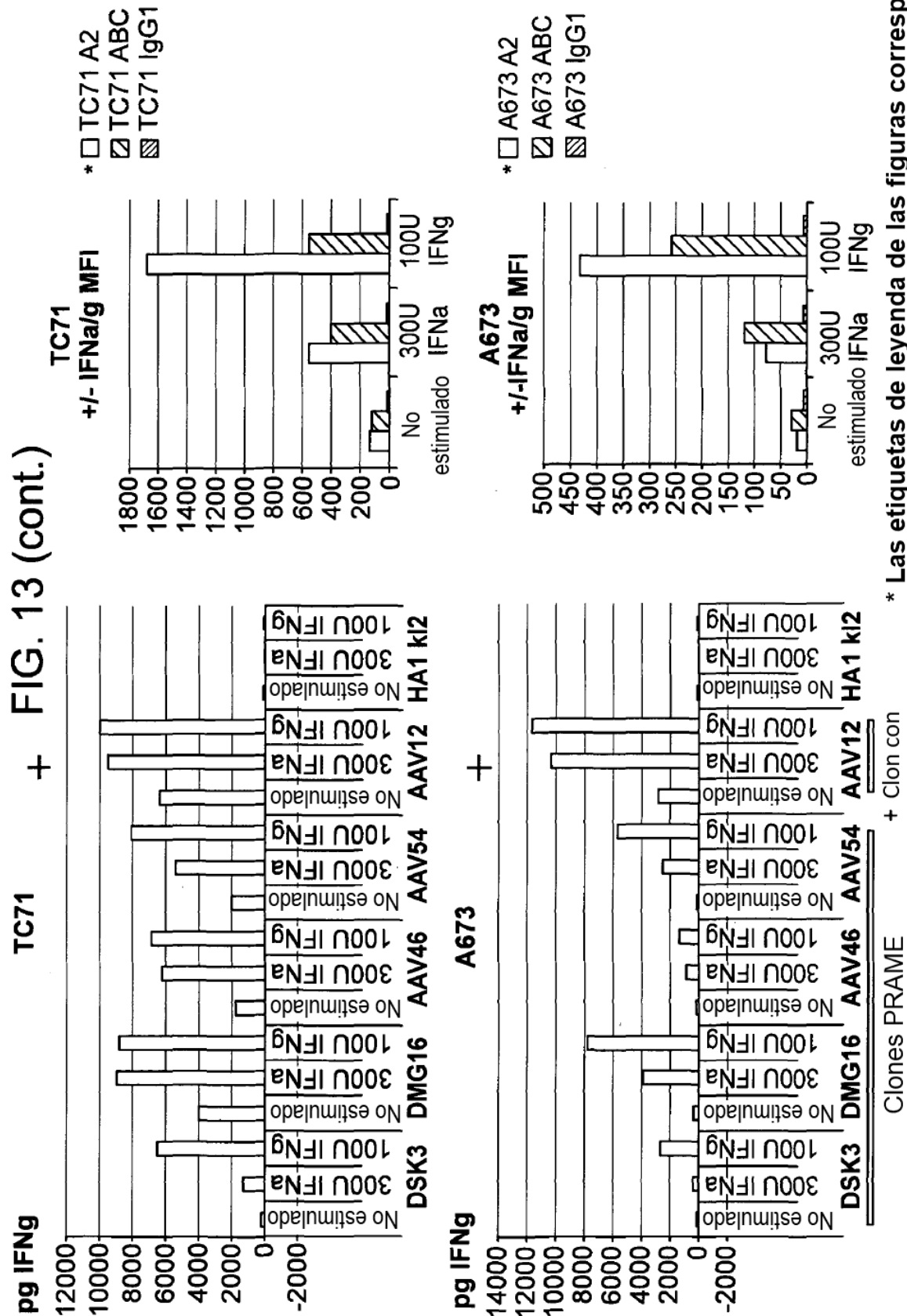


FIG. 13 (cont.)

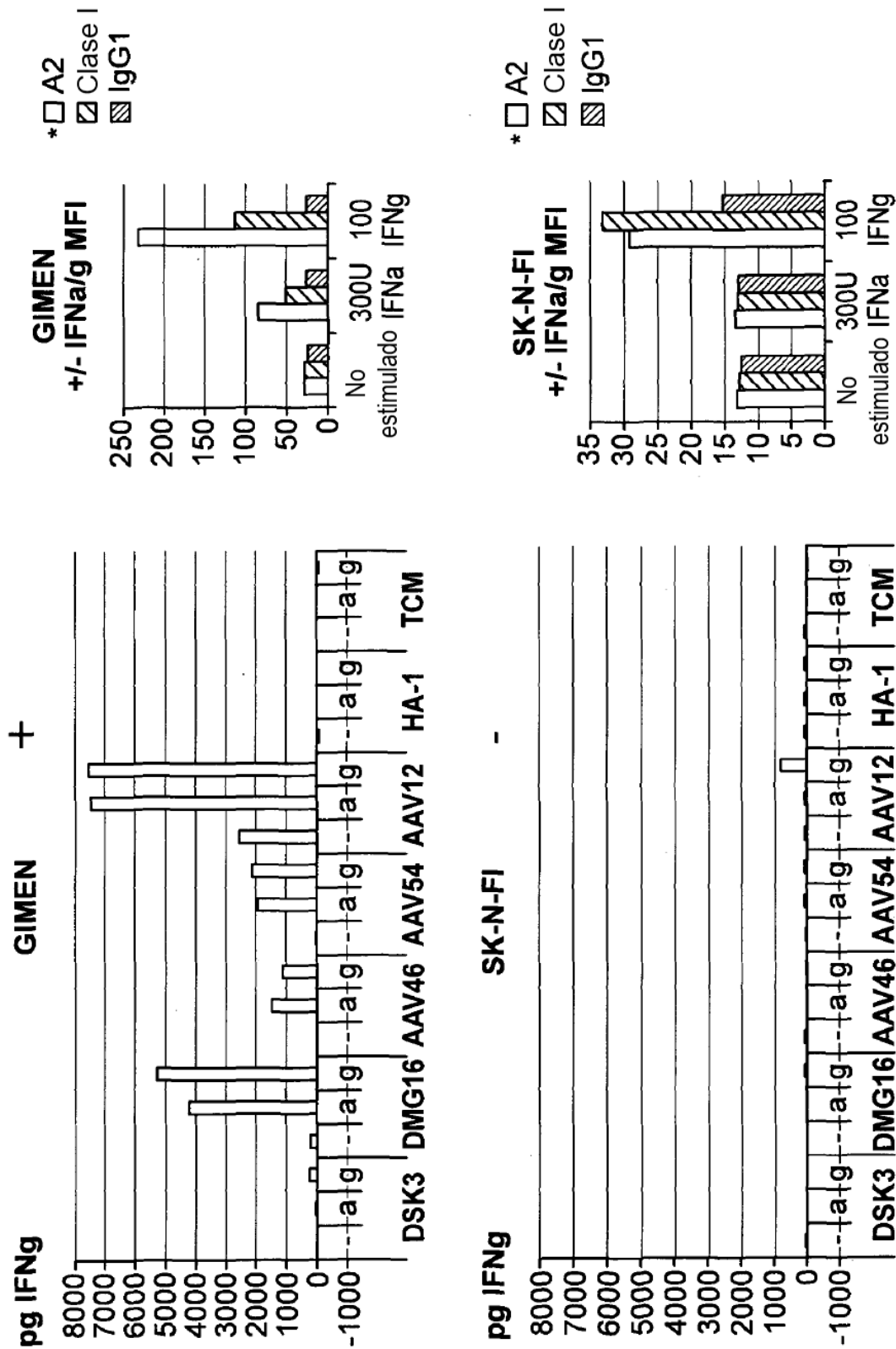


* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)



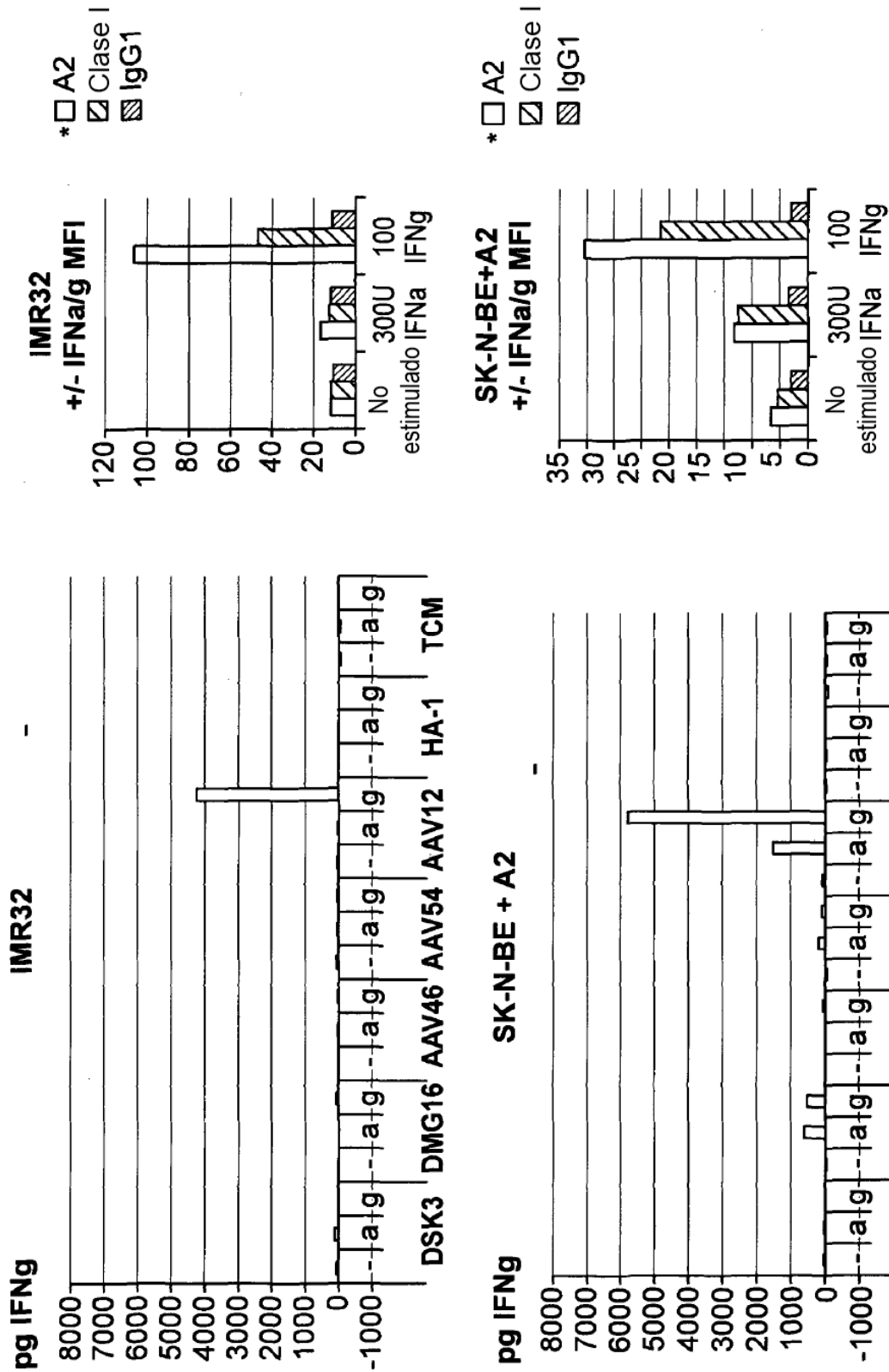
* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)

FIG. 14



* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)

FIG. 14 (cont.)



* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)

FIG. 14 (cont.)

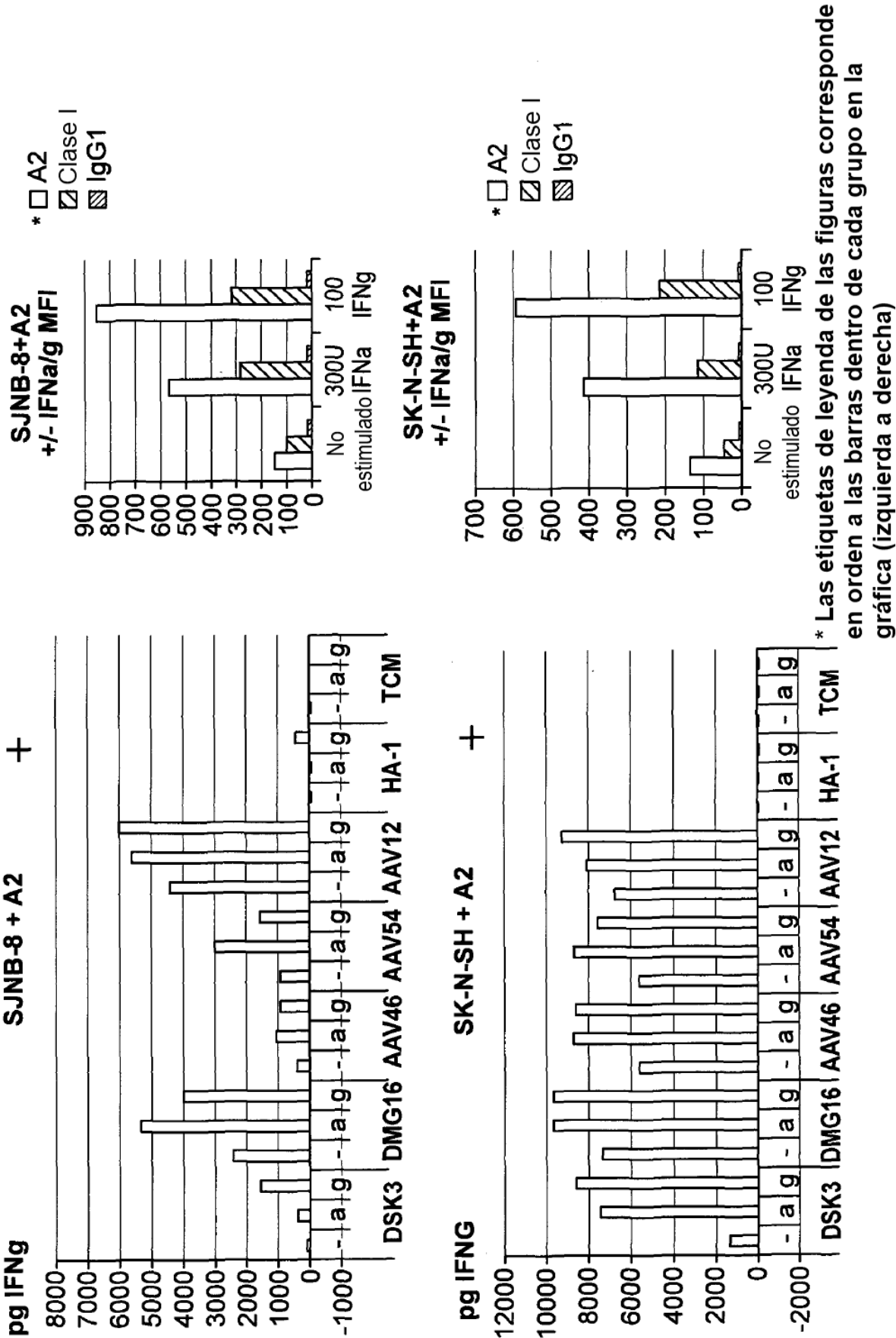
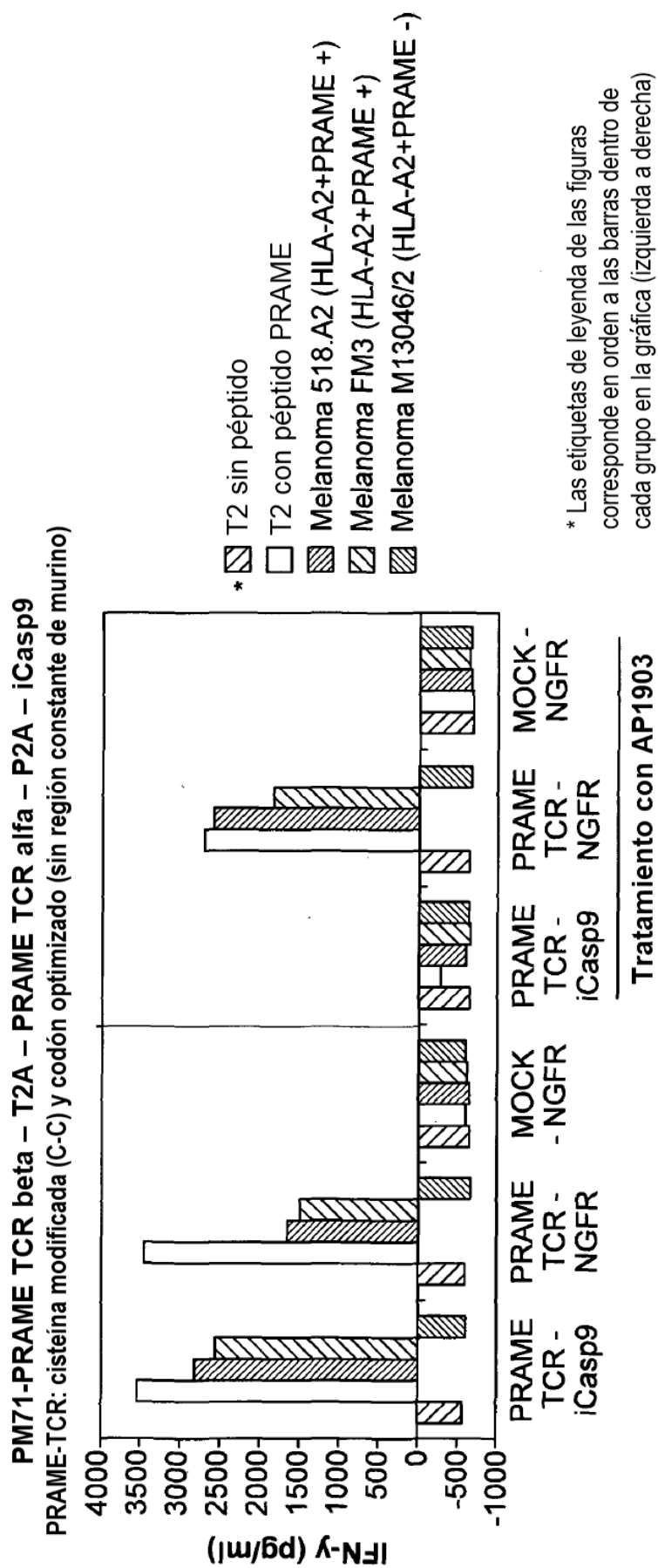


FIG. 15



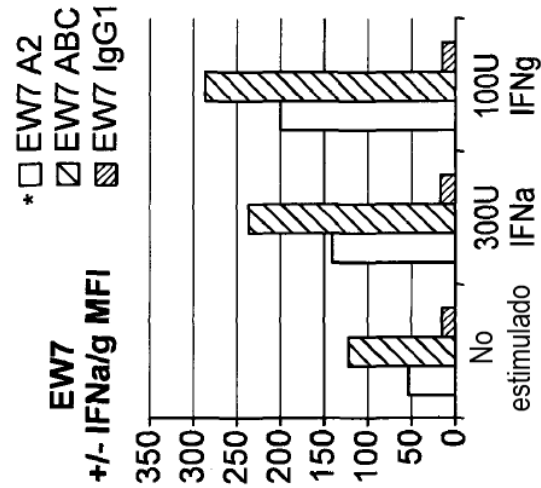
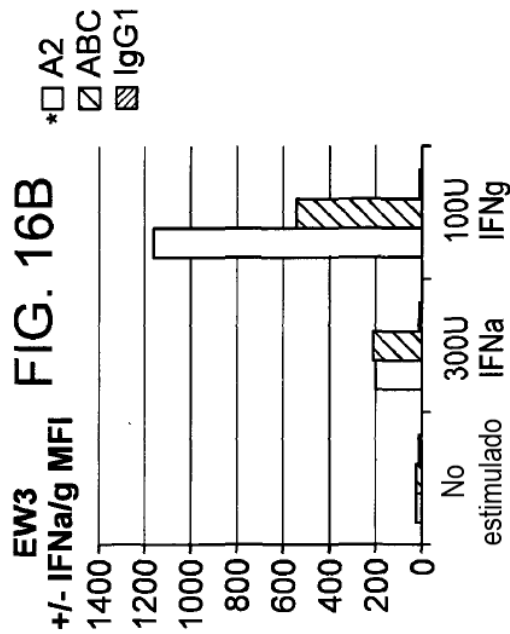
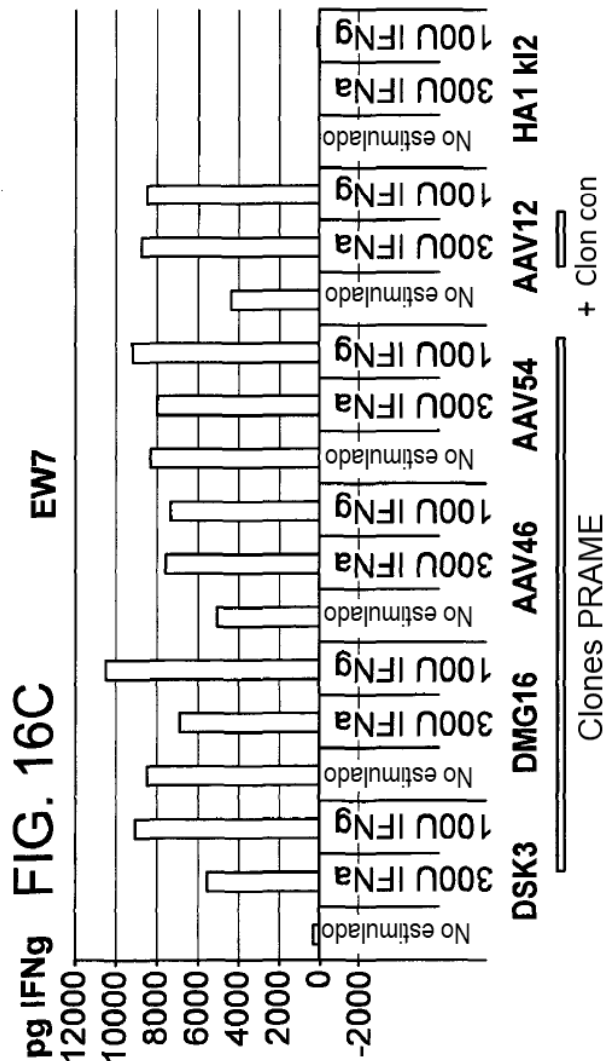


FIG. 16D



* Las etiquetas de leyenda de las figuras corresponde en orden a las barras dentro de cada grupo en la gráfica (izquierda a derecha)

Seq de Aminoácido de clon Prame 54 SLL (TRAV8-4*04, TRBV9*01) TCR en construcción PRAME/iCap9 TRAV8-4*04

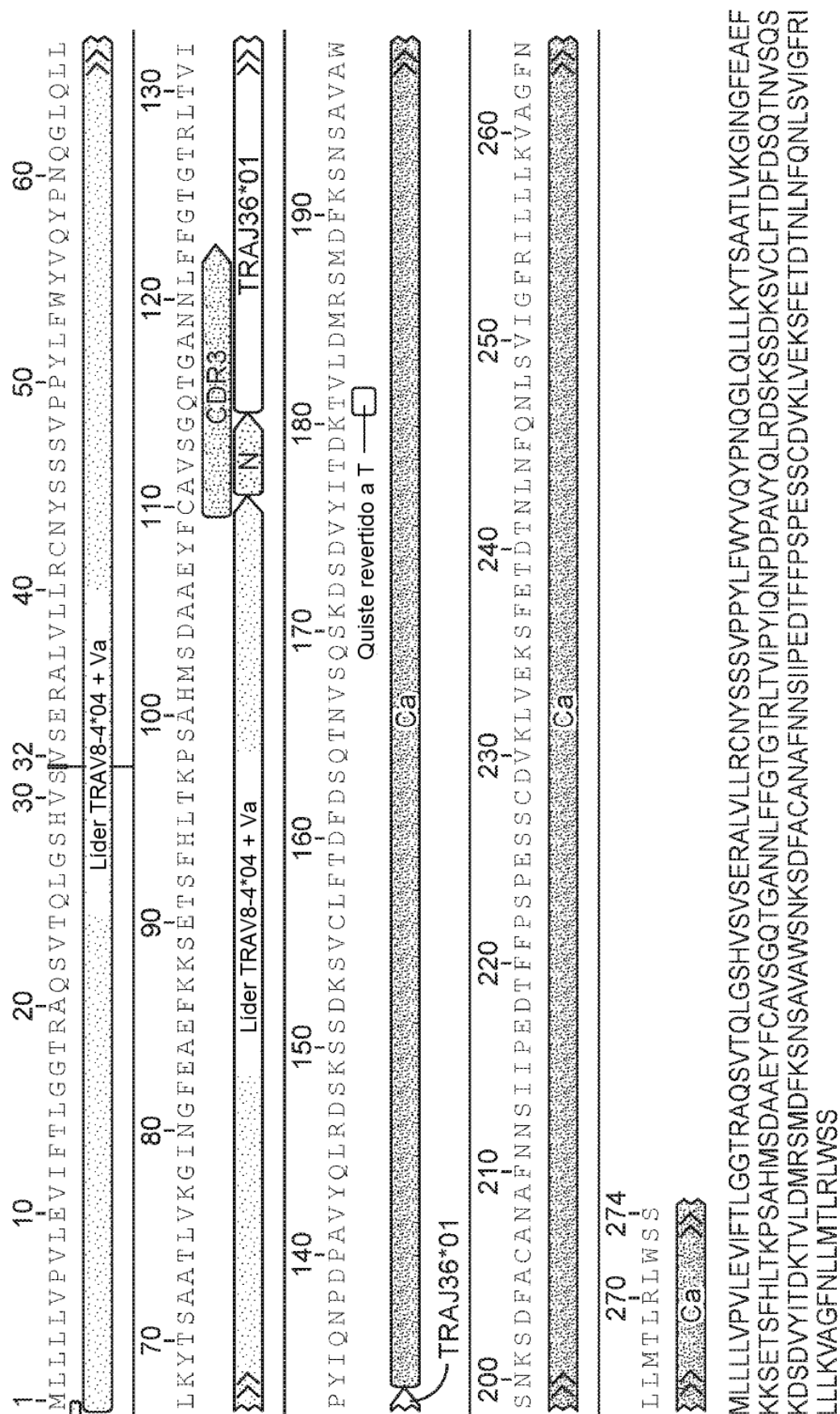


FIG. 17A

Seq de Aminoácido de clon Prame 54 SLL (TRAV8-4*04, TRBV9*01) TCR en construcción PRAME/iCap9 TRAV9*01

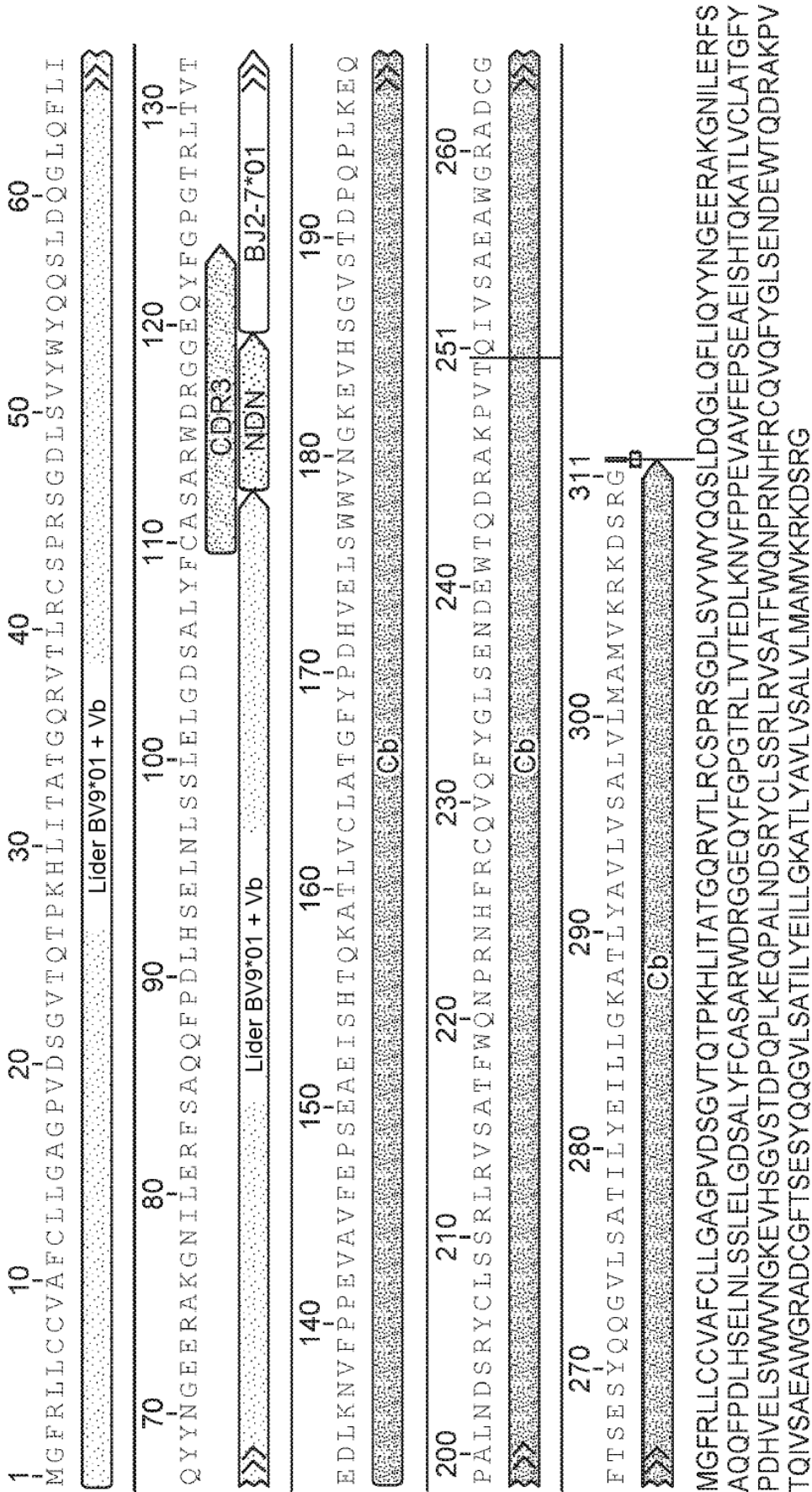


FIG. 17B

Seq de Aminoácido de clon Prame 46 SLL (TRAV35*02, TRBV28*01) TRAV35*02

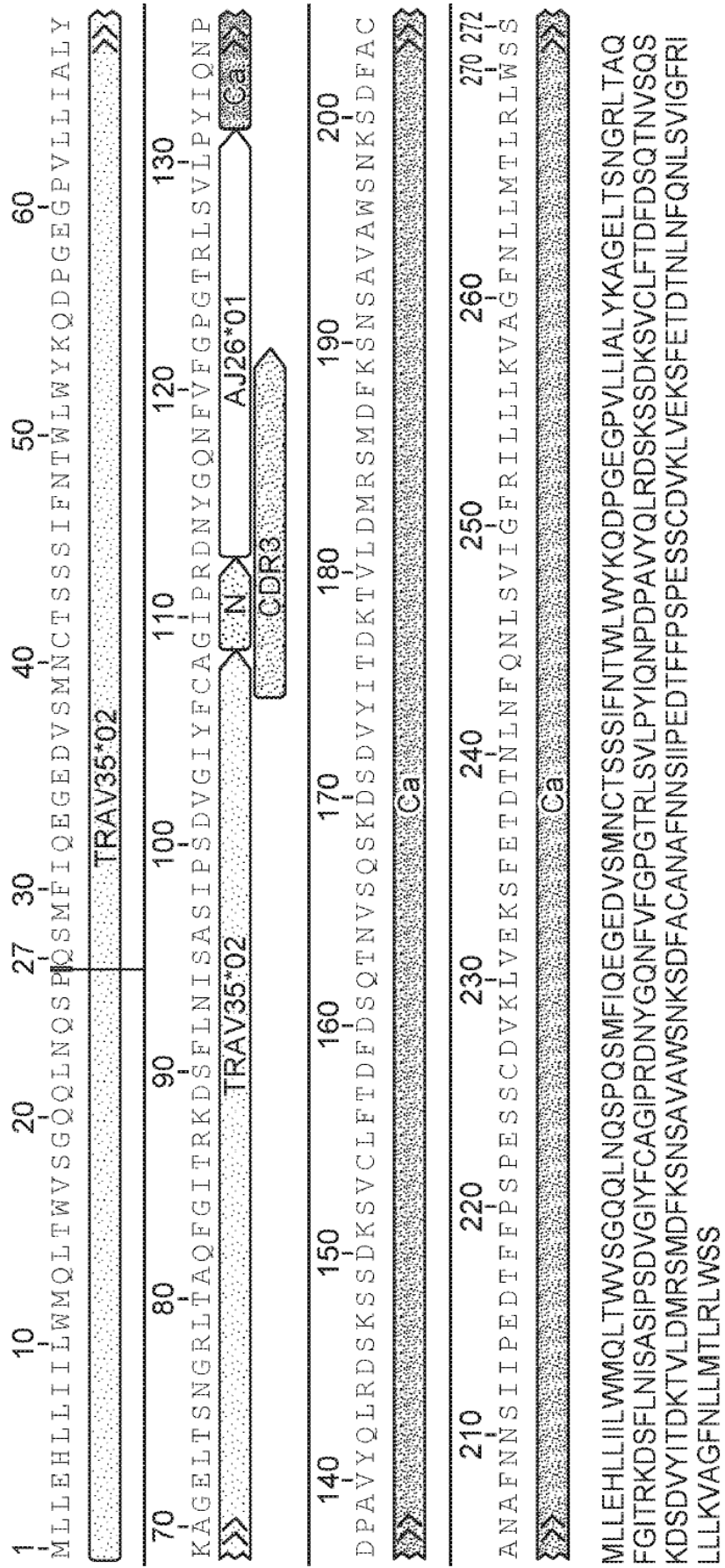


FIG. 18A

Seq de Aminoácido de clon Prame 46 SLL (TRAV35*02, TRBV28*01) TRAV28*01

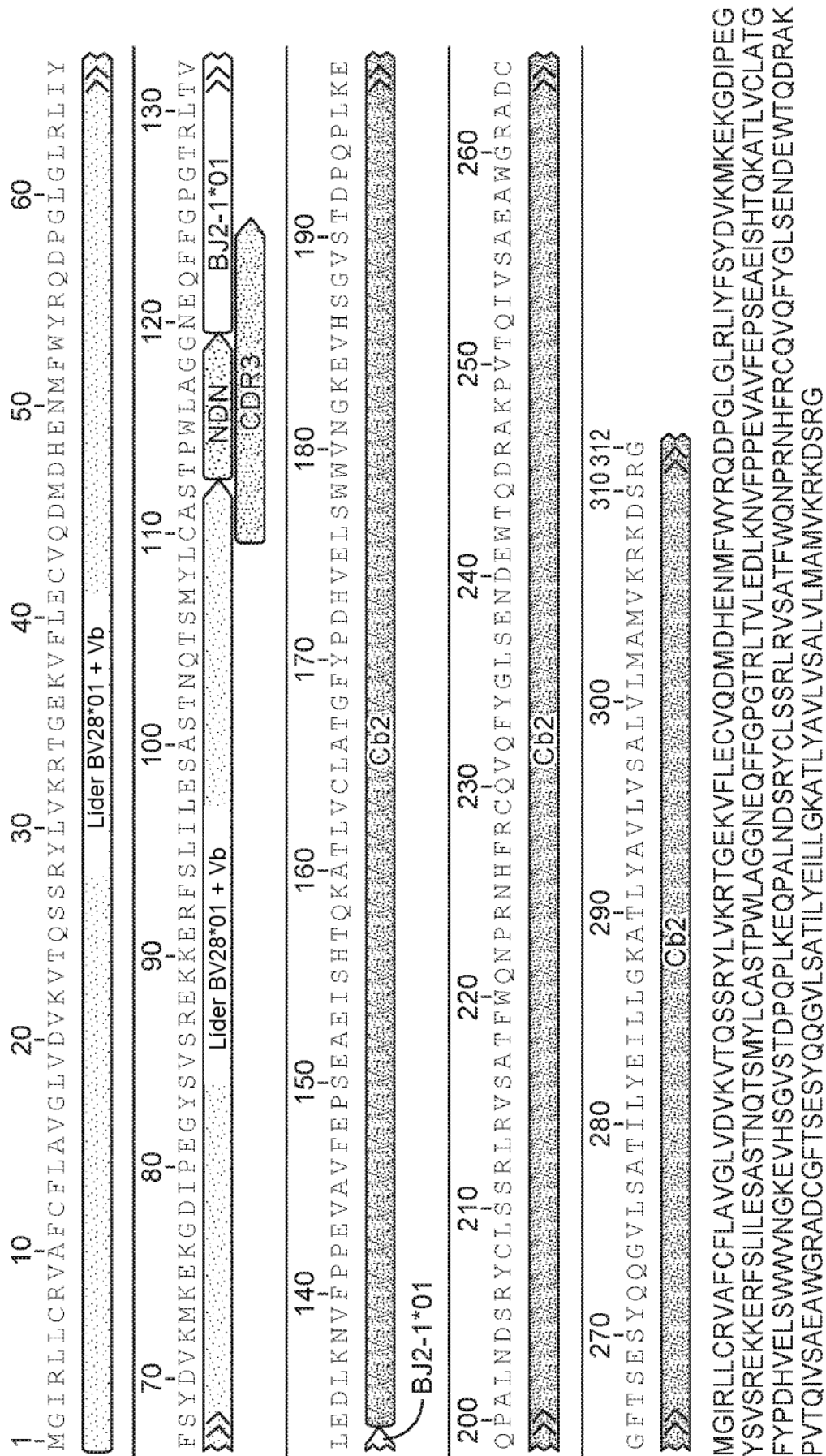


FIG. 18B

Seq de Aminoácido de clon de péptido DSK3 QLL (TRAV12-2*01, TRBV9*01) AV12-2*01

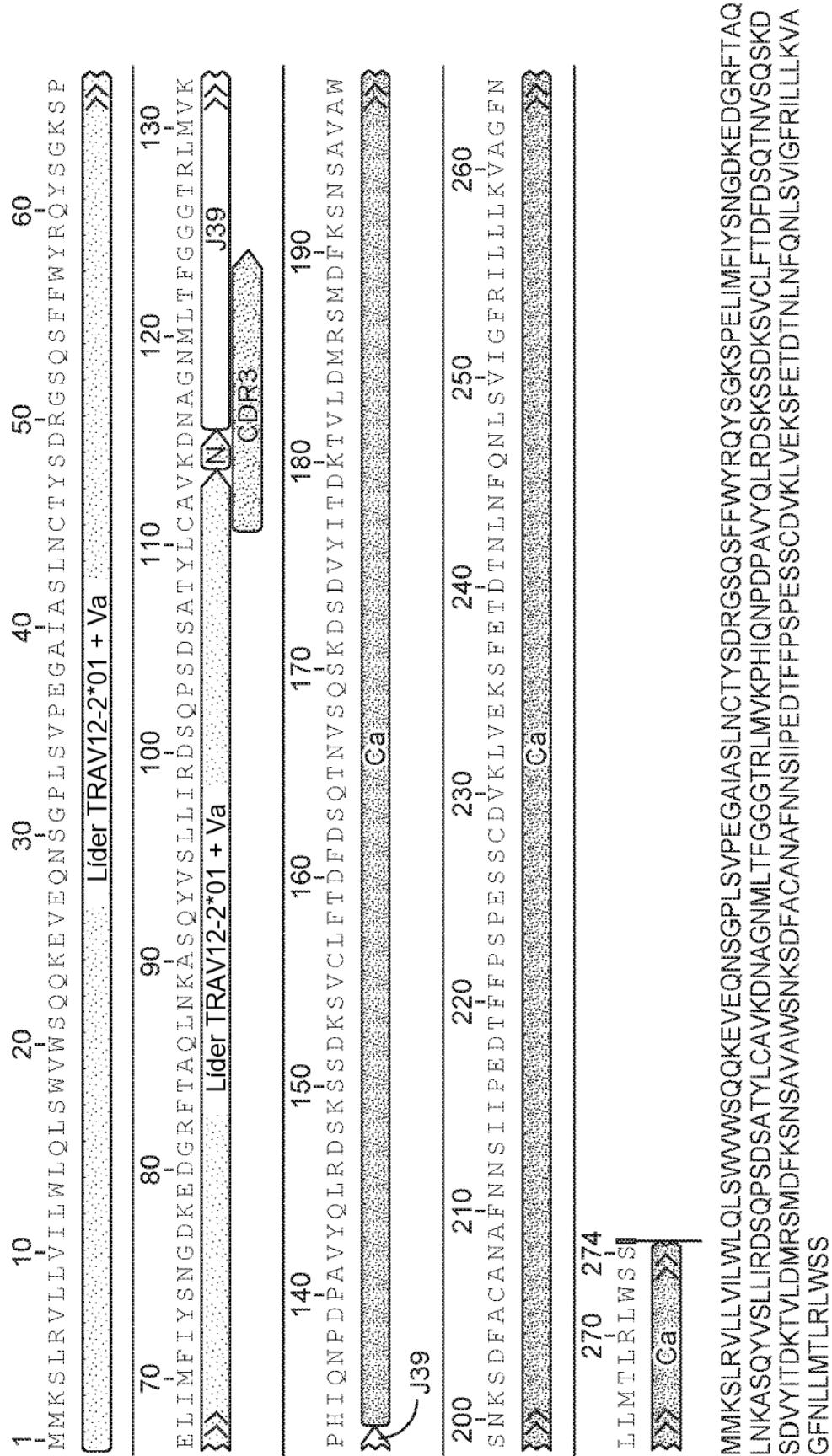


FIG. 19A

Seq de Aminoácido de clon Prame de péptido DSK3 QLL (TRAV12-2*01, TRBV9*01) BV9*01

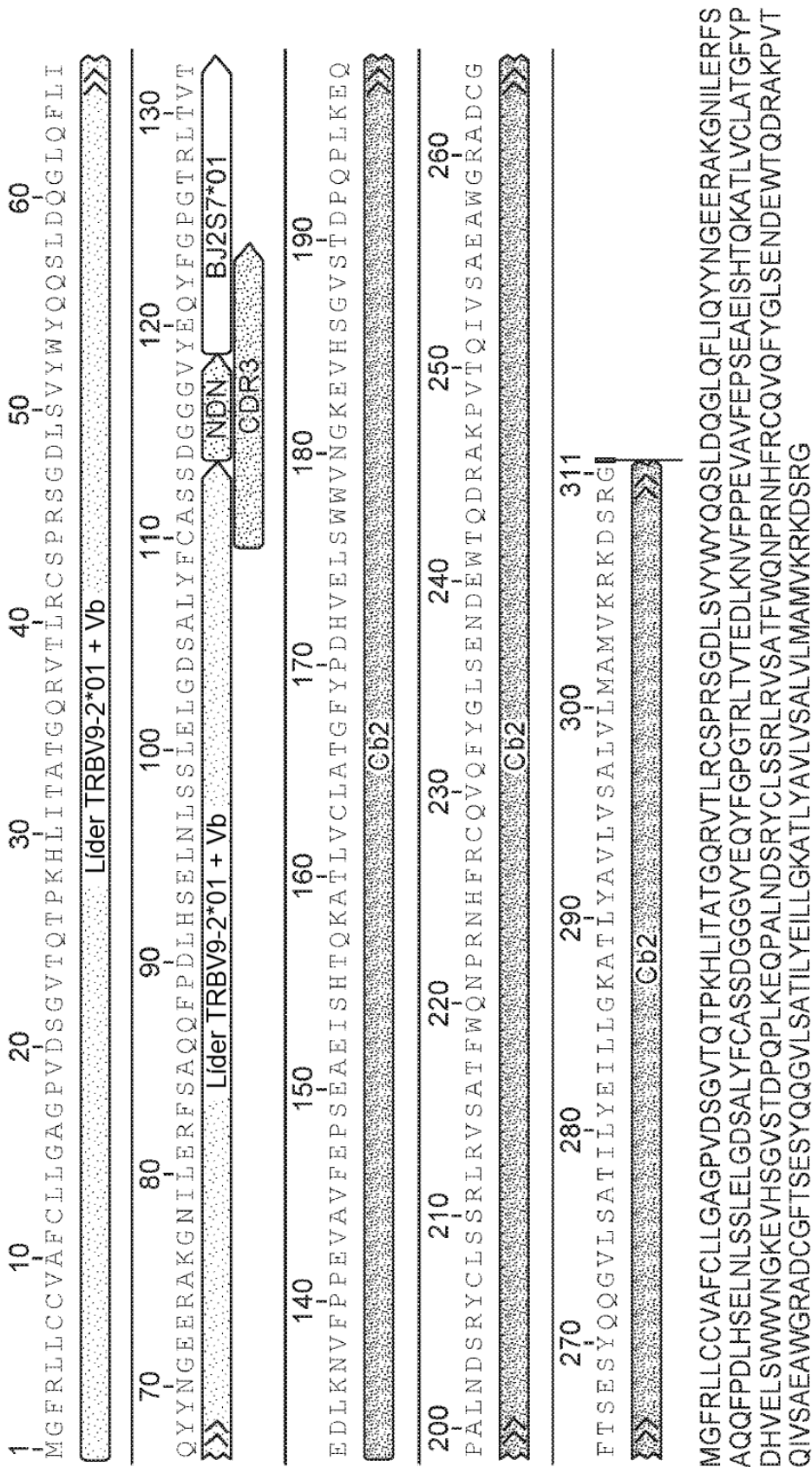


FIG. 19B

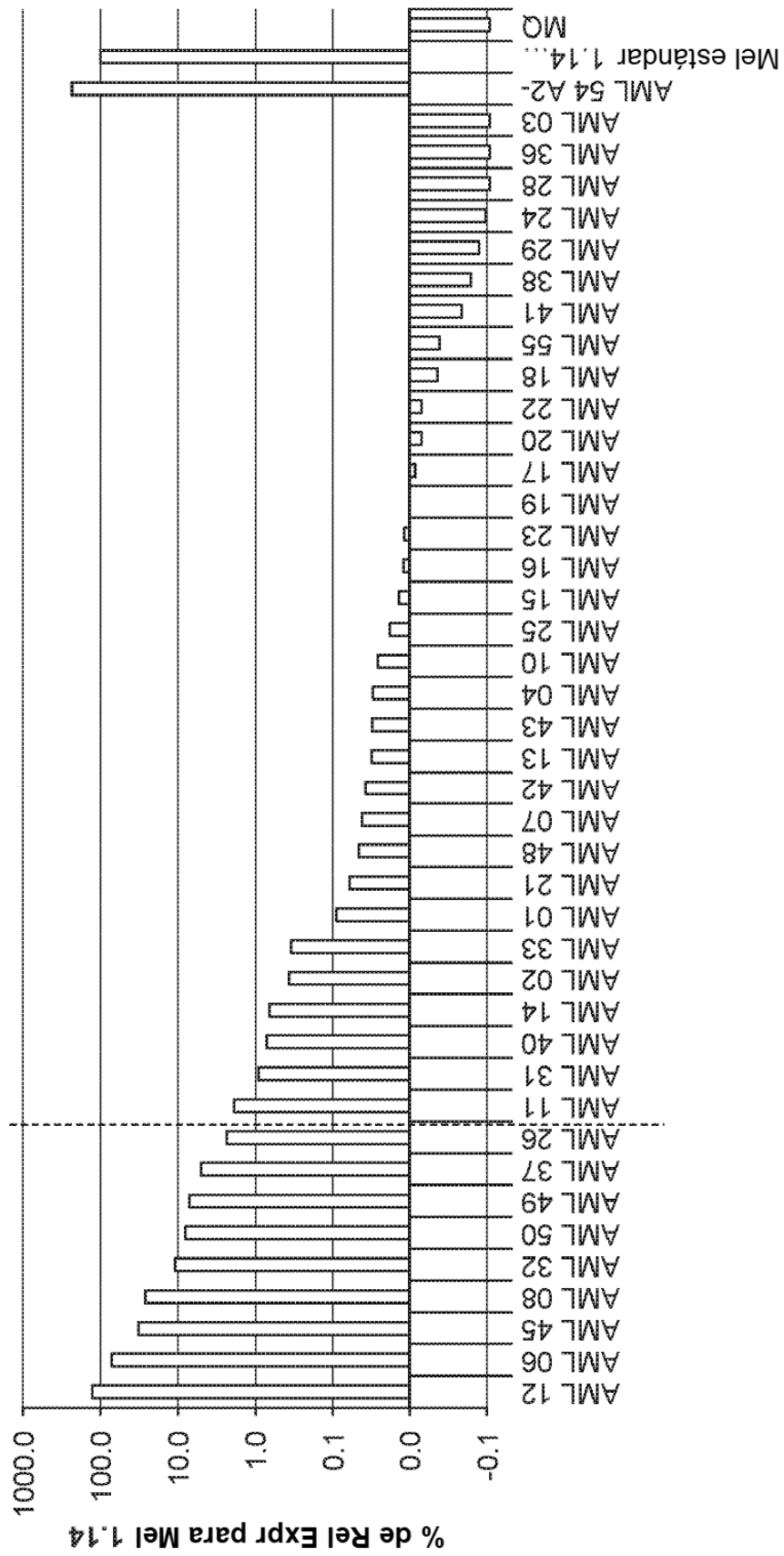


FIG. 20A

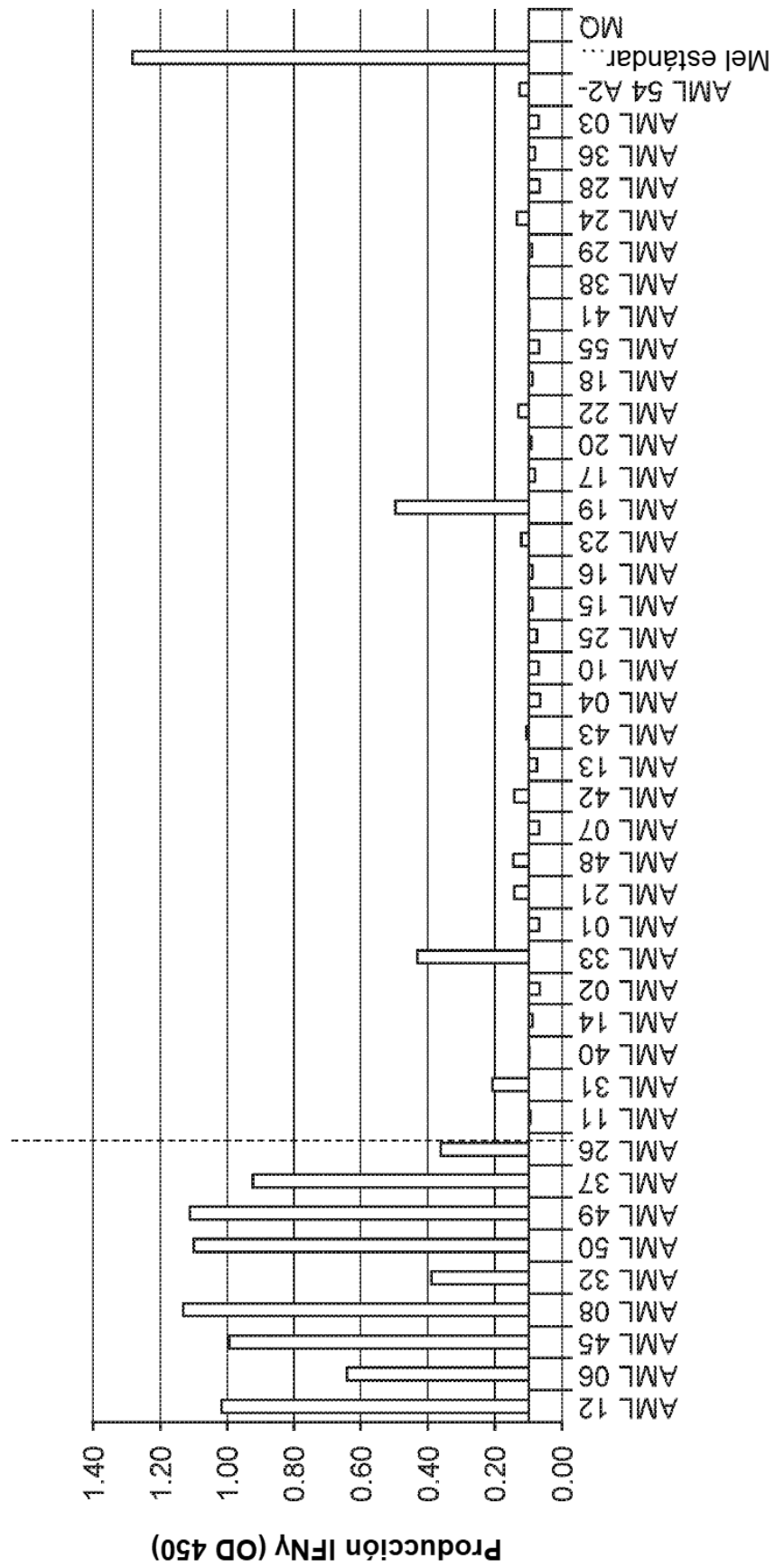


FIG. 20B



FIG. 21A

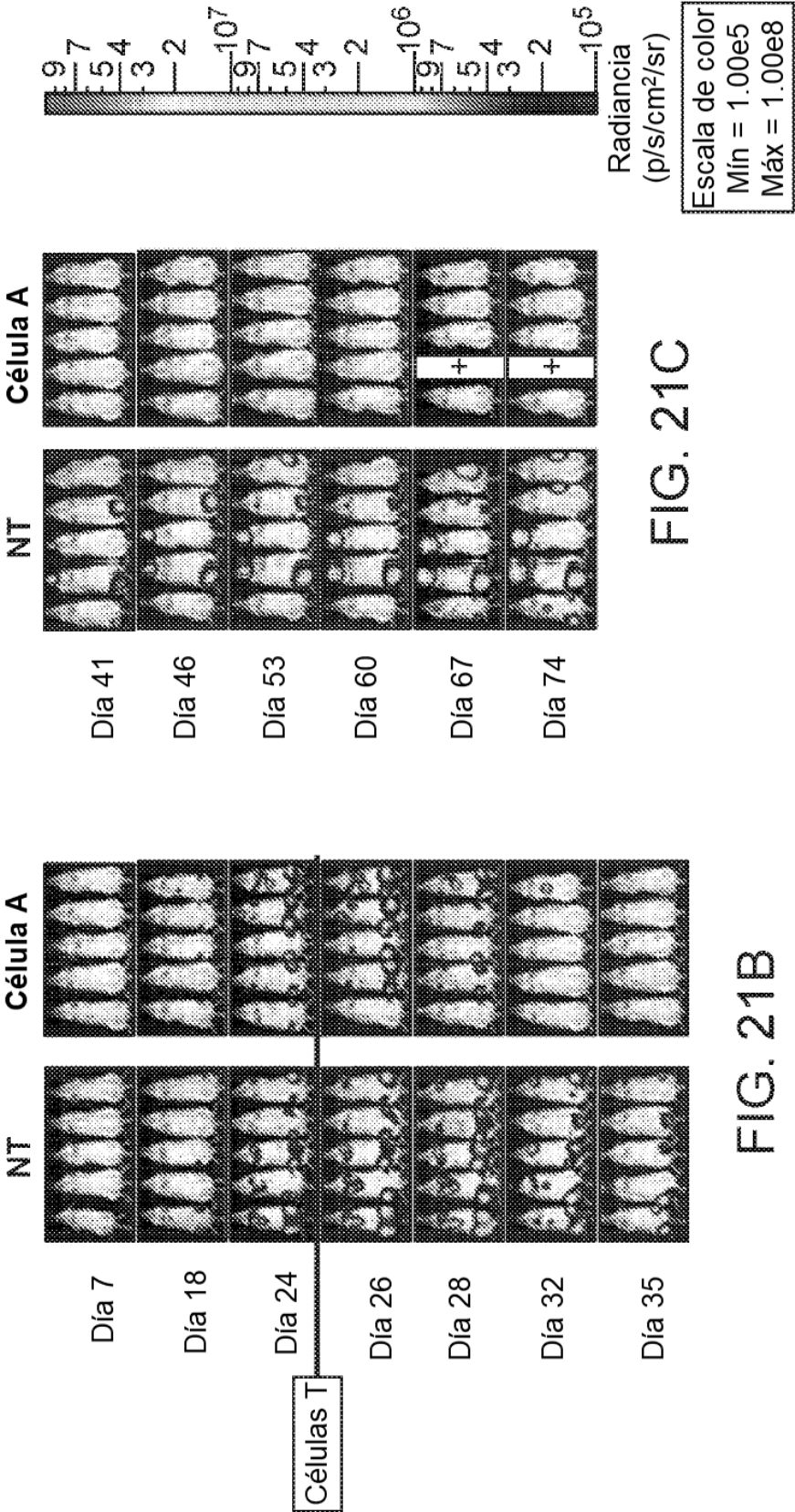


FIG. 21D

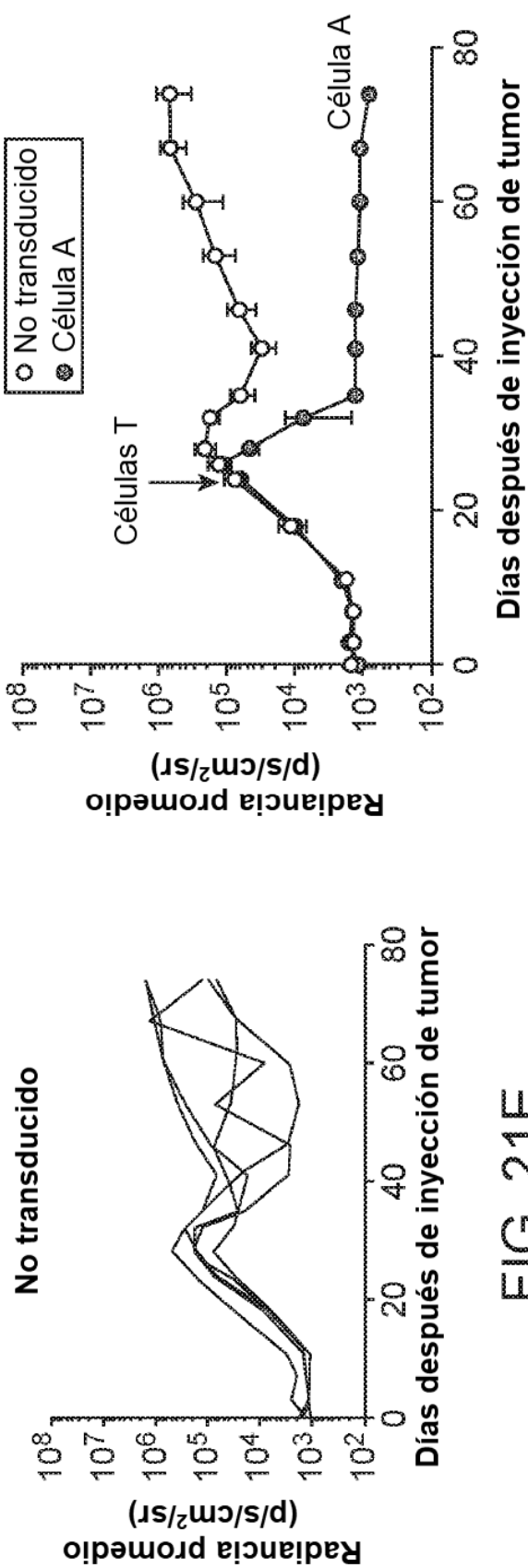


FIG. 21E

FIG. 21F

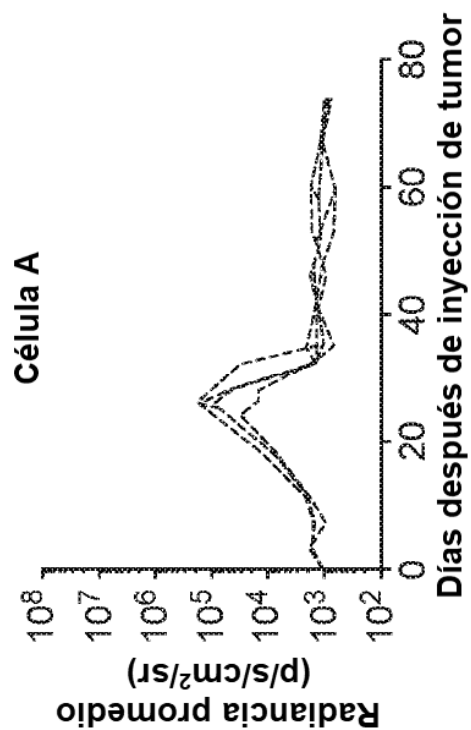


FIG. 21G

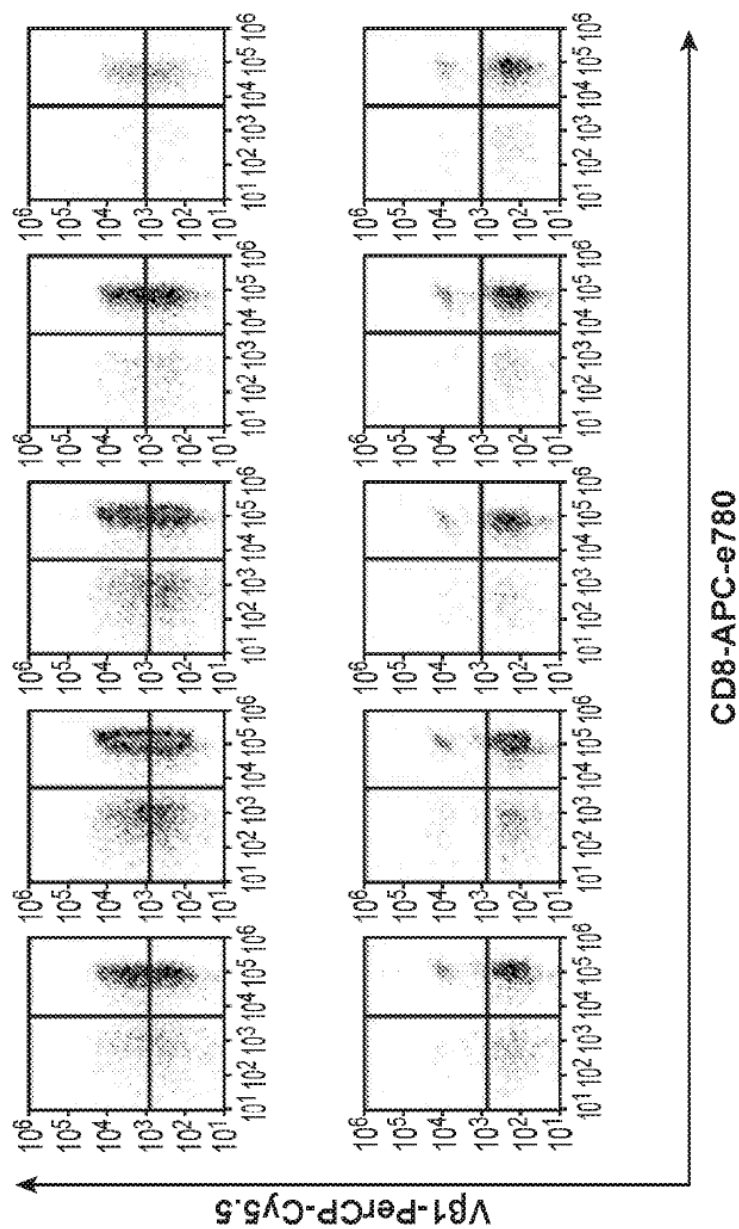


FIG. 22A

FIG. 22B

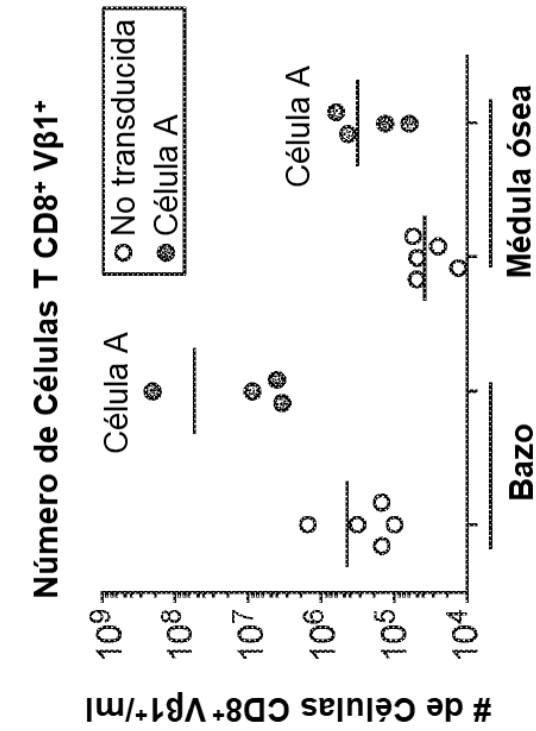


FIG. 23B

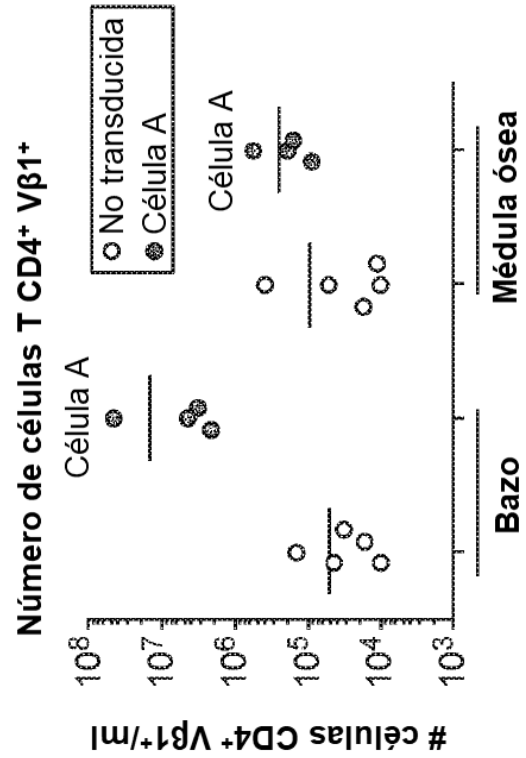


FIG. 23D

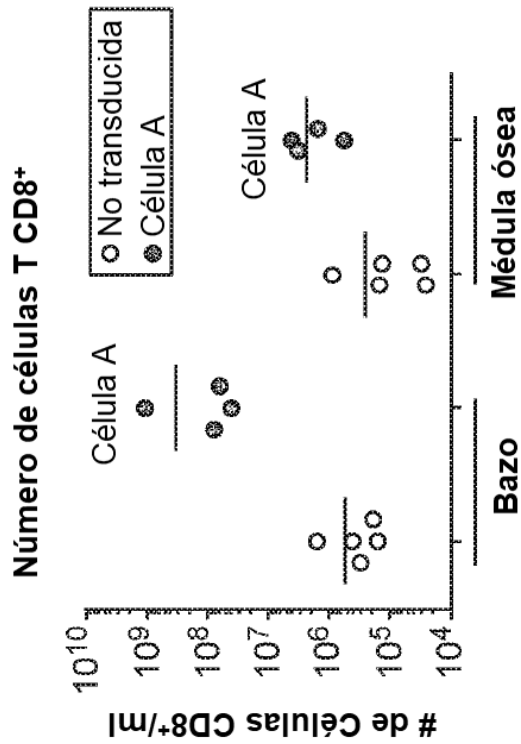


FIG. 23A

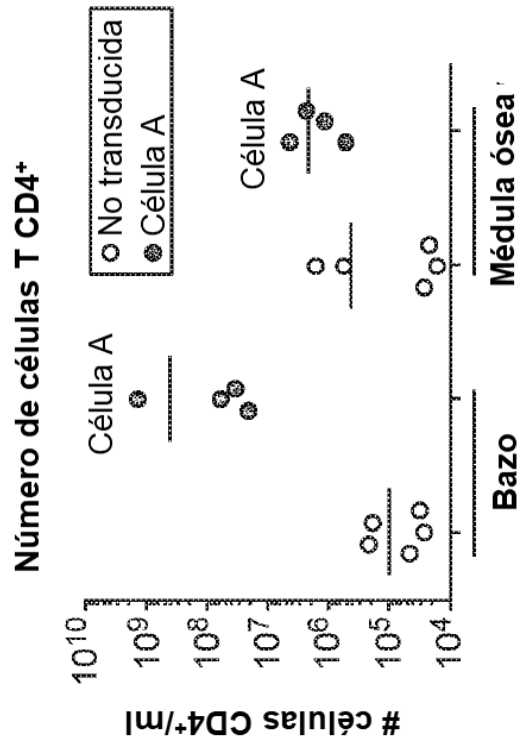


FIG. 23C

% de células T V β 1⁺ (fuera del total de células T humanas)

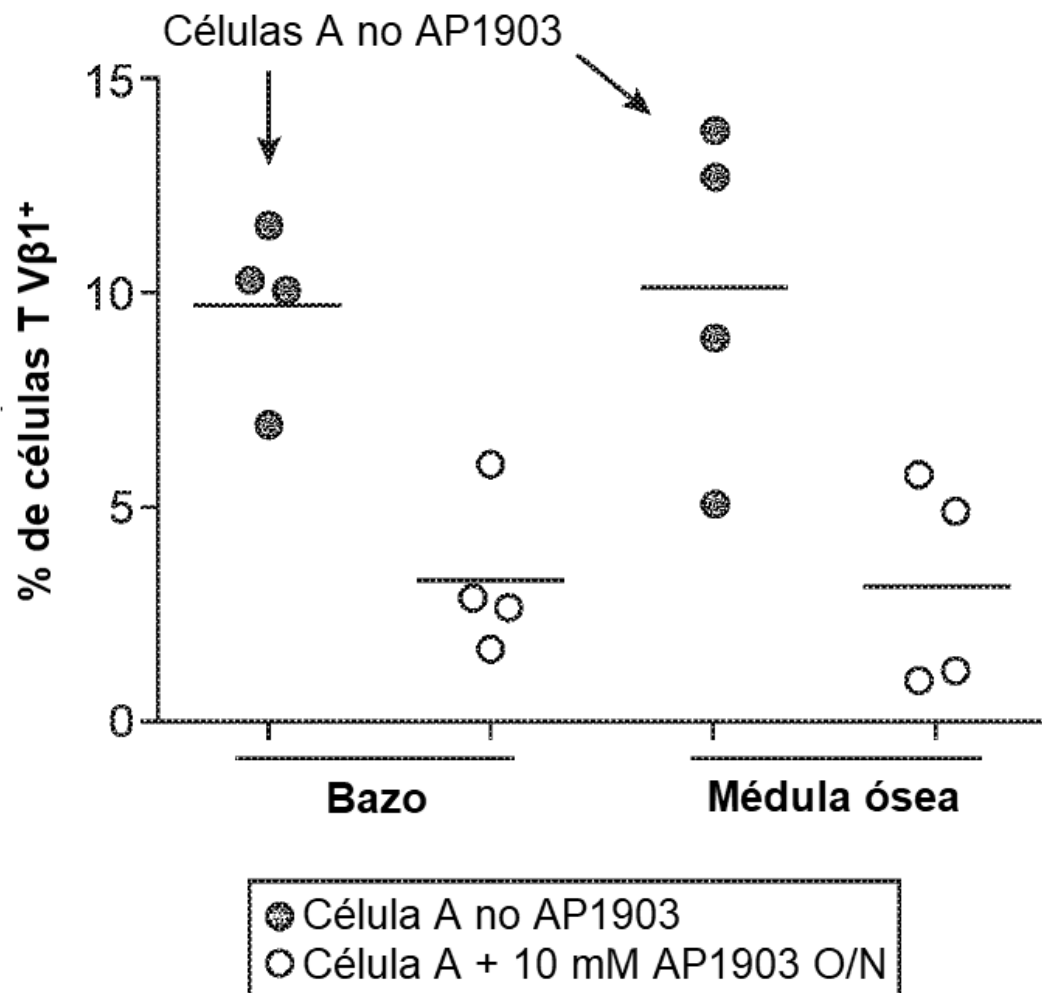


FIG. 24

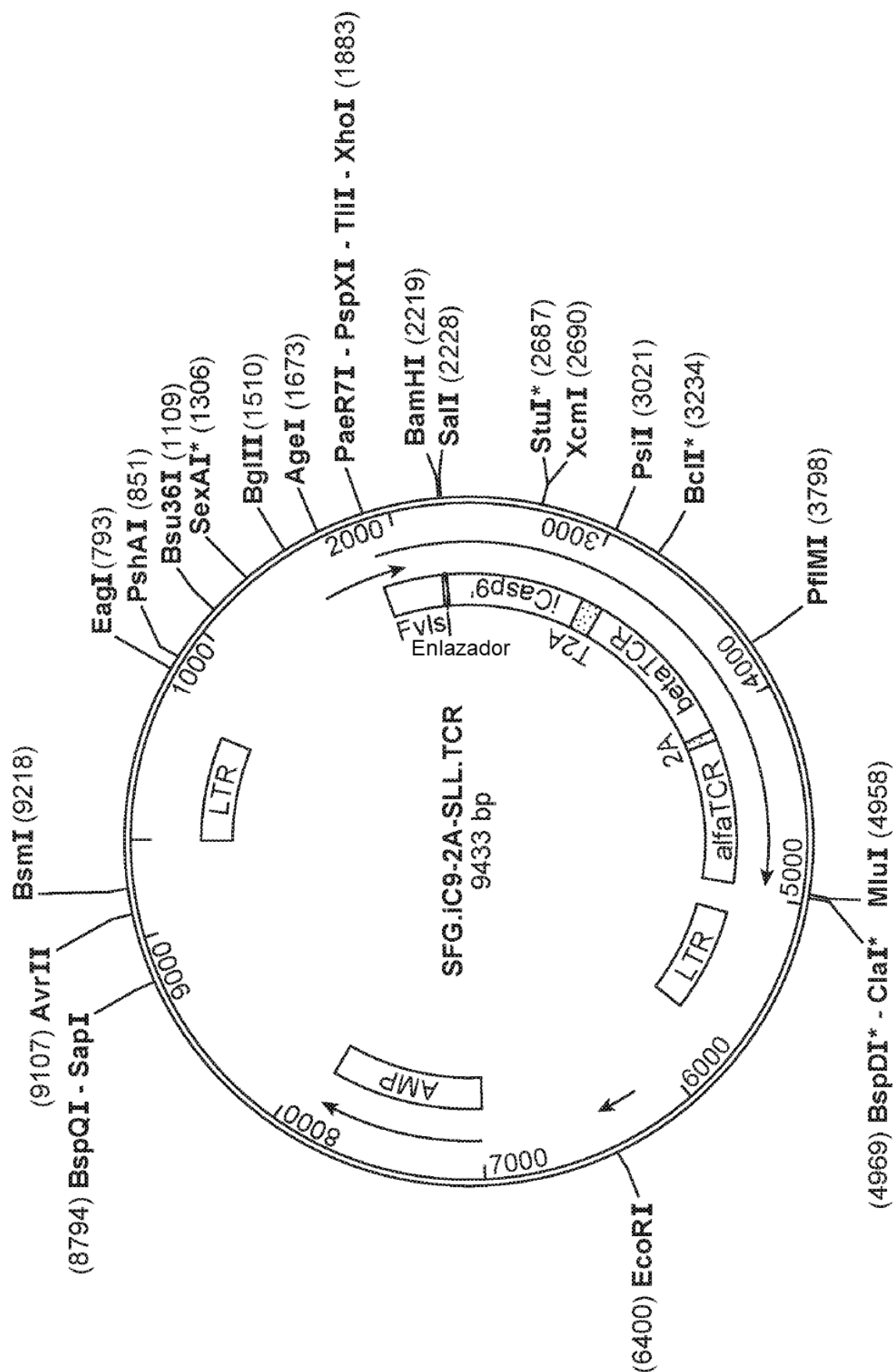


FIG. 25