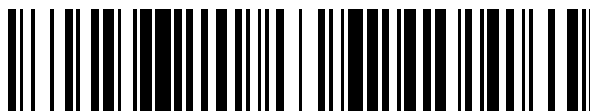


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 733**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2016** **PCT/EP2016/082443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017** **WO17109109**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2016** **E 16825764 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2021** **EP 3394247**

54 Título: **Generación novedosa de TCR específicos de antígeno**

30 Prioridad:

23.12.2015 EP 15202329

23.09.2016 EP 16190399

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2021

73 Titular/es:

MEDIGENE IMMUNOTHERAPIES GMBH (50.0%)

Lochhamer Straße 11

82152 Planegg-Martinsried, DE y

HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -

DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR

GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (50.0%)

72 Inventor/es:

MILOSEVIC, SLAVOLJUB;

ELLINGER, CHRISTIAN;

WEHNER, CARINA y

SCHENDEL, DOLORES

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 863 733 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

Generación novedosa de TCR específicos de antígeno

5 Campo de la invención

La presente invención contempla métodos para la generación de linfocitos T específicos de antígeno humano. Los métodos emplean señales de direccionamiento de CMH de clase II fusionadas con un antígeno o fragmento del mismo para obtener la presentación de CMH de las clases I y II de proteínas codificadas por ARN. Por consiguiente, la presente invención se refiere a vectores de expresión que comprenden señales de direccionamiento de CMH de clase II y al menos un antígeno o fragmento del mismo y a su uso para la generación *in vitro* de linfocitos T específicos de antígeno. También se describen clones de células T y receptores de células T (TCR) específicos para antígenos tumorales o antígeno virales.

15 Antecedentes de la invención

La transferencia adoptiva de células T usa respuestas citotóxicas basadas en células T para controlar las infecciones víricas crónicas y los tumores. Las células T que tienen una reactividad natural o modificada por ingeniería genética frente al cáncer de un paciente se generan *in vitro* y luego se transfieren de nuevo al paciente. La transferencia adoptiva de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) autólogos se han usado para tratar con éxito a pacientes con tumores avanzados. Las principales limitaciones de la terapia con TIL para su amplia aplicación en la clínica son la inmunogenicidad a veces deficiente de los tumores así como los mecanismos de la selección negativa de células T en el timo que eliminan de manera eficiente células T con especificidad de antígeno propia. Por tanto, en muchos casos, ni las células T con alta avidéz para antígenos específicos de tumor ni las células T con la especificidad deseada pueden aislarse a partir de la sangre o de resecciones tumorales del paciente. Por esto, la transferencia de linfocitos de sangre periférica (PBL) genéticamente redirigidos ofrece una posibilidad de superar estas limitaciones.

Además, en infecciones cancerosas y crónicas, los linfocitos T pierden su función y se agotan.

Con la ayuda de la terapia génica con receptores de células T (TCR), pueden generarse rápidamente millones de células T reactivas a tumores a partir de la sangre del paciente. La terapia génica con TCR allana el camino hacia un método flexible para transferir especificidad tumoral a subpoblaciones de células T expandibles y funcionalmente prometedoras. Comprende la transferencia de genes de TCR aislados de clones de células T específicos de antígeno definidos a linfocitos T receptores de donantes compatibles con antígeno leucocitario humano (HLA) para equiparlos con las especificidades de antígeno requeridas.

La terapia adoptiva de células T con linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ es una inmunoterapia prometedora para enfermedades cancerosas o víricas. Para aumentar las respuestas clínicas, la transferencia complementaria de células T cooperadoras CD4⁺ ofrece una posibilidad de potenciar las respuestas de CTL CD8⁺. Se sabe que los linfocitos T CD4⁺ proporcionan una ayuda fundamental a los CTL CD8⁺, así como que tienen un efecto crítico sobre la generación de células T de memoria CD8⁺ de larga duración. Por tanto, es importante el aislamiento y la caracterización rápidos y eficientes de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos de antígeno tumoral.

Muchos tumores expresan moléculas de CMH de clase II y, por tanto, los TCR de células T CD4⁺ son particularmente útiles para atacar directamente a estos tumores.

Para aumentar la capacidad de uso de la terapia celular adoptiva (ACT) para tratar a pacientes con tumores de crecimiento más rápido o enfermedades víricas crónicas, un objetivo es transferir células T efectoras enriquecidas, específicas de péptido (tanto células T CD4 cooperadoras como linfocitos T citotóxicos) que se han seleccionado por sus especificidades de ligando para atacar eficazmente a virus o células tumorales a la vez que se evita el grave ataque a tejidos normales. Estas células se expandirán rápidamente hasta grandes números *ex vivo* y luego se usarán para la ACT. Alternativamente, los receptores de células T (TCR) de tales células T específicas de ligando pueden clonarse y expresarse como transgenes de TCR en linfocitos activados, o bien usando linfocitos de sangre periférica receptores o bien clones de células T activados con especificidades definidas que crecen bien y no tienen la capacidad de atacar a tejidos normales del huésped.

Ellinger *et al.* (resumen de CIMT Cancer Immunotherapy, mayo de 2013) se refieren generalmente al direccionamiento de la expresión de CMH de clase II para la generación de CD4 específica de antígeno tumoral.

Kavanagh *et al.* (Blood, 107(5): 1963-1969) describen la expansión de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de VIH mediante células dendríticas transfectadas con ARNm que codifica para Nef dirigido al citoplasma o al lisosoma.

Wehner *et al.* (J. Immunotherapy of Cancer vol. 2, supl. 3), pág. 65, describen la generación de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno tumoral mediante la presentación simultánea de epítopos de CMH I y II *in vitro* e *in*

vivo.

El documento US 2005/1124141 A1 describe composiciones y métodos para tratar un tumor o una enfermedad neoplásica en un huésped, que emplean conjugados que comprenden polipéptidos o ácidos nucleicos superantigénicos con otras estructuras que se unen preferentemente a una célula tumoral y que son capaces de inducir la apoptosis.

El documento EP 2 700 708 A2 se refiere a métodos de potenciación *in vitro* e *in vivo* de la capacidad estimuladora de células T de DC humanas y al uso de los mismos en la vacunación contra el cáncer.

Van Nuffel *et al.* (Molecular Therapy 20(5): 1063-1074 describen que células dendríticas cargadas con ARNm que codifica para antígenos tumorales de longitud completa sensibilizan células T CD4+ y CD8+ en pacientes con melanoma.

Como consecuencia, son necesarios TCR específicos de antígeno y métodos eficientes para el aislamiento de estos TCR.

Objetivos y sumario de la invención

Por tanto, un objetivo de la invención es proporcionar métodos eficientes para el aislamiento de células T con TCR específicos de antígeno. Sería deseable proporcionar un método para la generación de TCR CD4 y/o TCR CD8. Además, un objetivo de la invención es proporcionar TCR o partes funcionales de los mismos, tales como regiones CDR3. Sería ventajoso lograr que los TCR mostraran una afinidad alta y/u óptima contra antígenos tumorales.

Por tanto, un primer aspecto de la invención contempla un método para generar linfocitos T específicos de antígeno humano, que comprende las siguientes etapas:

A) expresión de al menos una proteína de fusión, que comprende

- al menos un antígeno o un fragmento del mismo,

- una secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) precedente al extremo N-terminal del antígeno, y

- un dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica tras el extremo C-terminal del antígeno,

en células presentadoras de antígeno; y

B) exposición de una población de células que comprende linfocitos T a las células presentadoras de antígeno de la etapa A) *in vitro* para activar linfocitos T específicos de antígeno expresado por la célula presentadora de antígeno,

en el que la proteína de fusión comprende al menos dos antígenos o fragmentos de los mismos diferentes, en el que los fragmentos tienen una longitud de un mínimo de 9 aminoácidos.

La fusión de la secuencia de direccionamiento, en particular en combinación con la secuencia señal de translocación en el RE, con el antígeno o fragmento del mismo deseado permite la carga eficiente de complejos CMH de clase II, también para proteínas celulares que se presentan habitualmente por medio del complejo CMH de clase I. Además, la carga de los complejos CMH de clase I se logra mediante el método descrito anteriormente. Por tanto, el método permite la generación de TCR CD4+ así como TCR CD8+.

La expresión de la al menos una proteína de fusión en la etapa A) puede ser una expresión transitoria o expresión estable, preferiblemente una expresión transitoria, por ejemplo, mediante la introducción de ivt-ARN que codifica para la al menos una proteína de fusión. La expresión de ivt-ARN tiene la ventaja de que puede producirse rápidamente ivt-ARN de calidad controlada y que no porta ningún contaminante proteico inmunogénico.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además la etapa de enriquecimiento de linfocitos T activados. Esta etapa de enriquecimiento comprende normalmente las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con al menos una molécula de unión que se une específicamente a al menos una proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados;

(b) aislar linfocitos T a los que se une al menos una molécula de unión.

En realizaciones preferidas, la al menos una proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados se selecciona del grupo que comprende Ox40, CD137, CD40L, PD-1, receptor de IL-2, interferón- γ , IL-2, GM-CSF y TNF- α . Además, en la etapa (a), las células pueden ponerse en contacto además con una molécula de unión que se une específicamente a CD4 y/o con una molécula de unión que se une específicamente a CD8.

En realizaciones específicas, la selección de células T CD4 activadas comprende las siguientes etapas:

(a1) poner en contacto la población de células de la etapa B) con un anticuerpo contra CD40 para bloquear la interacción entre CD40-CD40L de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T específicos de antígeno y acumular CD40L en la superficie de los linfocitos T;

(a2) poner en contacto la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con un anticuerpo anti-CD40L;

(b) aislar los linfocitos T marcados con un anticuerpo anti-CD40L y un anticuerpo anti-CD4.

Otra realización se refiere al método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además la etapa C2) identificación de linfocitos T específicos de antígeno, que comprende las siguientes etapas:

a) incubación de clones celulares expandidos de la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con

(i) células presentadoras de antígeno tal como se define en la etapa A), y

(ii) células presentadoras de antígeno de control;

b) comparación del perfil de activación de la incubación con (i) y (ii) para cada clon celular;

c) identificación de clones celulares específicos de antígeno basándose en la comparación de b); en el que la activación mediante (i), pero no mediante (ii), indica que el clon celular es específico de antígeno; la activación mediante (i) y mediante (ii) indica que el clon celular es inespecífico de antígeno; la activación ni mediante (i) ni mediante (ii) indica que el clon celular no está activado.

En la etapa B), las células presentadoras de antígeno se añaden a la población de células que comprende linfocitos T al menos una vez, o al menos dos veces o al menos tres veces, o tres veces. El intervalo de tiempo entre adiciones repetidas de células presentadoras de antígeno puede ser de 7 a 21 días, de 12 a 16 días o de 13 a 15 días, o 14 días.

La secuencia señal de translocación en el RE se deriva de una proteína asociada endosómica/lisosómica. La proteína asociada endosómica/lisosómica puede seleccionarse del grupo que consiste en LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 o CD1b, preferiblemente la proteína asociada endosómica/lisosómica es LAMP1. Preferiblemente, la secuencia señal de translocación en el RE es humana. En realizaciones específicas, la secuencia señal de translocación en el RE comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o un fragmento de la misma. En realizaciones más específicas, la secuencia señal de translocación en el RE consiste en la siguiente secuencia SEQ ID NO: 33.

El dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede derivarse de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP. Preferiblemente, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es humano.

Normalmente, las células presentadoras de antígeno se seleccionan de células dendríticas, células B activadas, monocitos, macrófagos, líneas celulares linfoblastoideas transformadas con VEB, preferiblemente células dendríticas, más preferiblemente células dendríticas derivadas de monocitos.

Habitualmente, la población de células que comprende linfocitos T es una población de linfocitos de sangre periférica. La población de células que comprende linfocitos T puede ser una población de linfocitos de sangre periférica sin separar. La población de células puede enriquecerse en linfocitos T, preferiblemente linfocitos T CD8+ y/o CD4+ mediante medios conocidos por el experto en la técnica.

Otro aspecto de la solicitud es un linfocito T que puede obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un vector de expresión, que comprende:

- una secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) humana, y

5 - un dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica,

10 - una secuencia que codifica para al menos dos antígenos diferentes, o fragmentos de los mismos, que se inserta entre la secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) humana y el dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica;

en el que cada uno de los fragmentos tiene una longitud de un mínimo de 9 aminoácidos.

15 El vector puede comprender un promotor para la transcripción de ARNm *in vitro*. La secuencia señal de translocación en el RE se deriva de una proteína asociada endosómica/lisosómica, por ejemplo, LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68, CD1b, lo más preferiblemente LAMP1. Preferiblemente, la secuencia señal de translocación en el RE es humana. En realizaciones específicas, la secuencia señal de translocación en el RE comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o un fragmento de la misma. En realizaciones más específicas, la secuencia señal de translocación en el RE consiste en la siguiente secuencia SEQ ID NO: 34.

25 La secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede derivarse de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP. La secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es normalmente una parte de un dominio transmembrana y citoplásmico. Por tanto, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede derivarse de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP. Preferiblemente, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica y/o lisosómica es humano. Normalmente, la secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica comprende el motivo Y-XX (X representa cualquier aminoácido natural) seguido por un aminoácido hidrófobo (SEQ ID NO: 38). Preferiblemente, la secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es YQRI (SEQ ID NO: 39). El dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 54 o un fragmento de la misma.

35 En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende además sitios de restricción entre la secuencia señal de translocación en el RE y el dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica. En otras realizaciones, el vector comprende además al menos un antígeno, o un fragmento del mismo, que se inserta entre la secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) humana y el dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica.

40 En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de longitud completa de un antígeno. Alternativamente, el vector comprende un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de un antígeno.

50 Normalmente, el antígeno es un antígeno tumoral o un antígeno viral. El antígeno tumoral puede seleccionarse del grupo que consiste en antígeno tumoral viral, antígeno específico de tumor, antígeno asociado al tumor y un antígeno que porta mutaciones específicas del paciente y que se expresa en células tumorales del paciente. El antígeno tumoral es un antígeno asociado al tumor, preferiblemente el antígeno asociado al tumor es un antígeno de cáncer de testículo (antígeno C/T). El antígeno C/T puede seleccionarse del grupo que comprende miembros de la familia MAGE, por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, pero sin limitarse a los mismos, antígenos tumorales que comprenden mutaciones puntuales, NY-ESO1, antígeno de tumor de testículo 1B, GAGE-1, SSX-4, XAGE-1, BAGE, GAGE, SCP-1, SSX-2, SSX-4, CTZ9, CT10, SAGE y CAGE. Preferiblemente, el antígeno C/T puede seleccionarse del grupo que consiste en GAGE-1, SSX-4 y XAGE-1.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del vector de expresión tal como se describe en el presente documento para la generación *in vitro* de linfocitos T específicos de antígeno.

60 Un aspecto adicional de la invención se refiere a T-linfocitos para su uso en un método de prevención o tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un mamífero los linfocitos T generados mediante los métodos tal como se describen en el presente documento.

65 Otro aspecto se refiere a un método para generar un TCR específico de antígeno, que comprende las etapas de los métodos descritos anteriormente y que comprende además la etapa de aislar un TCR a partir del linfocito específico de antígeno activado generado mediante los métodos tal como se describen en el presente

documento.

Otro aspecto se refiere a TCR específicos para GAGE-1, SSX-4 y XAGE-1, respectivamente.

5 Leyendas de las figuras

Figura 1: presentación dirigida de CMH de clase II para la activación y el aislamiento de células T CD4⁺ específicas de antígeno. (a) Representación esquemática de los diversos constructos de EBNA-3C usados para validar la funcionalidad y necesidad de la señal CrossTag. Se representan el ORF (ATG a PARADA), los diferentes componentes de la señal CrossTag (LAMP1 y DC-LAMP), el epítipo de EBNA-3C restringido por HLA-DR11 (3H10) y el tramo poliA120. (b) La señal CrossTag facilita la presentación cruzada eficiente de CMH de clase II. La secreción de IFN- γ del clon de células T CD4⁺ específico de EBNA-3C, 3H10, a las 16 h de cultivo conjunto con CPA transfectadas con ivt-ARN (DC derivadas de monocitos preparada en tres días (3d-mDC) o líneas celulares linfoblastoideas (mLCL) transformadas con mini-virus de Epstein-Barr (VEB)). Los valores se presentan como la media + DE de triplicados. (c) La expresión del marcador de activación CD40L es adecuada para el aislamiento de células T CD4⁺ específicas de antígeno. Se mezclaron células 3H10 marcadas con violeta CellTrace™ con PBL autólogos en concentraciones decrecientes y se cultivaron conjuntamente con mDC transfectadas con ivt-ARN y EBNA-3C-CrossTag (CPA) del donante autólogo. Se evaluó la expresión de CD40L inducida por la activación en células T CD4⁺ a las 6 h de cultivo conjunto.

Figura 2: inducción y enriquecimiento de células T CD4⁺ específicas de antígeno C/T a partir de PBL sin separar. (a) Expresión en superficie de CD40L y CD137 inducida por la activación en células T CD4⁺ a partir de PBL sensibilizados con antígeno C/T. Se midió la expresión del marcador de activación 6 h después de la reestimulación específica del cultivo *in vitro* de PBL el día 13 y 27, respectivamente. (b) Comparación directa de la capacidad proliferativa de líneas de células T CD4⁺ CD40L^{positivo} y CD40L^{negativo} en masa. El día 28, se separaron las células T CD4⁺ del cultivo de PBL sensibilizados según su expresión de CD40L. Se evaluaron los números de células totales después de la separación mediante FACS (día 0) y al final del intervalo de 14 días tras la reestimulación específica (día 14). Se representa la proliferación en x veces en relación con el día 0. (c) Comparación de la secreción de citocinas inducidas tras la reestimulación específica de antígeno. Se midió la secreción de IFN- γ de líneas de células T CD4⁺ CD40L^{positivo} y CD40L^{negativo} en masa a las 16 h de cultivo conjunto con mDC transfectadas con ivt-ARN y CrossTag-antígeno. Los valores se presentan como la media + DE de triplicados.

Figura 3: selección de clones de células T CD4⁺ específicos de antígeno C/T. (a) Datos de selección a modo de ejemplo de clones derivados del cultivo de PBL sensibilizados con antígeno C/T. Se evaluó la secreción de IFN- γ a las 16 h de cultivo conjunto con mDC transfectadas con ivt-ARN y CrossTag-antígeno (mezcla de 4 antígenos). Las barras representan valores individuales. (b) Validación de la reactividad al antígeno C/T de clones de células T seleccionados. Se evaluó la secreción de citocinas (IFN- γ y GM-CSF) después del cultivo conjunto con mLCL transfectadas con ivt-ARN (mezcla de 4 antígenos). Los datos se representan como valores individuales. (c) Confirmación de la expresión del correceptor de CD4. Se muestran clones a modo de ejemplo.

Figura 4: evaluación de la especificidad de antígeno. Datos a modo de ejemplo para clones de células T CD4⁺ que se encontró que mostraban especificidad de antígeno C/T individual. Se midió la secreción de IFN- γ después del cultivo conjunto con mLCL transfectadas con ivt-ARN. Los valores se presentan como la media + DE de duplicados o como puntos de datos individuales cuando se indica (*).

Figura 5: necesidad de señal CrossTag y reconocimiento de proteínas. (a) Necesidad de la señal CrossTag para la activación de clones de células T CD4⁺ basada en ivt-ARN. (b) Reconocimiento de proteínas recombinantes exógenas fisiológicamente procesadas. La capacidad estimuladora de CPA transfectadas con ivt-ARN y antígeno-CrossTag (mLCL) en comparación directa con mLCL transfectadas con antígeno-ivt-ARN que carece de la señal CrossTag (a) o mLCL cargadas con proteína recombinante (b) tal como se mide mediante la secreción de IFN- γ de clones de células T CD4⁺ aislados que portan TCR únicos. CPA con simulación y células T solas sirvieron como controles. Los valores se presentan como la media + DE de triplicados.

Figura 6: definición de secuencias de núcleo de epítipos de CMH de clase II. Se validaron fragmentos de péptido encontrados mediante la identificación directa de epítipos de CMH de clase II (DEPI) (caja con línea discontinua) usando constructos cortos de CrossTag-ivt-ARN. Se cultivaron conjuntamente células T 3H10 transgénicas GAGE-1-TCR-2 (a) o células T XAGE-1-TCR-1 y -TCR-2 (b), o bien con constructo corto de CrossTag-ivt-ARN solapante (indicado como barras negras) o bien con CPA transfectadas con ivt-ARN y antígeno-CrossTag (mLCL) de longitud completa. Se evaluó la secreción de IFN- γ a las 16 h de cultivo conjunto y se representan las secuencias de núcleo de epítipos reconocidos (caja con línea continua).

Cultivos conjuntos con CPA transfectadas con simulación o células T solas sirvieron como controles. Los valores se presentan como la media + DE de triplicados.

Figura 7: expresión transgénica de receptores de células T CD4⁺ específicos de antígeno C/T. Se transfectaron células T 3H10 con ivt-ARN que codifica para las cadenas TCR- α y - β correspondientes de los clones de células T CD4⁺ GAGE-1-TCR-1, XAGE-1-TCR-1 o -TCR-2. Se cultivaron conjuntamente TCR-células 3H10 transgénicas con CPA cargadas con antígeno (mLCL) y se detectó la secreción de IFN- γ a las 16 h de cultivo conjunto. Cultivos conjuntos con CPA transfectadas con simulación o células T solas sirvieron como controles. Los valores se presentan como la media + DE de triplicados.

Figura 8: la señal CrossTag facilita la carga de CMH de clase II a través de las rutas de presentación internas [endógenas] de células. Se transfectaron DC positivas para HLA-DRB1*11:01 y negativas para HLA-DRB1*11:01 con ivt-ARN y EBNA-3C-CrossTag. Se incubaron conjuntamente DC transfectadas y sin transfectar en todas las posibles combinaciones y se cultivaron conjuntamente 12 h después con clones de células T CD4⁺ específicos de EBNA-3C, 3H10. Se midió la secreción de IFN- γ de células 3H10 a las 16 h de cultivo conjunto con DC. Los valores se presentan como la media + DE de triplicados.

Figura 9: caracterización de 3d-mDCs para la sensibilización de PBL. (a) Expresión de marcadores de superficie tal como se detecta mediante tinción con anticuerpos monoclonales (curvas abiertas) y controles de isotipo coincidentes (curvas grises rellenas). (b) Niveles de ARNm de antígenos de mDC transfectadas con ivt-ARN. Se representa el aumento en x veces de los números de copia de ARNm de antígenos en relación con mDC sin transfectar. Se evaluaron los números de copia de ARNm de antígeno mediante qRT-PCR usando específico de antígeno cebadores.

Figura 10: estrategia de regulación de la clasificación basada en CD40L de células T CD4⁺ específicas de antígeno C/T. Se seleccionaron linfocitos según su dispersión hacia delante (FSC; FSC-A: área de dispersión hacia delante; FSC-H: altura de dispersión hacia delante) y hacia los lados (SSC-A). Se usó DAPI para la exclusión de células muertas. Posteriormente, se clasificaron las células positivas para CD4-de la fracción individual de células (FSC-A/FSC-H) según su expresión de CD40L y se establecieron como líneas de células T CD4⁺ CD40L^{positivo} y CD40L^{negativo} en masa. Además, se clasificaron las células T CD4⁺ CD40L^{positivo} en placas de 96 pocillos basándose en células individuales.

Figura 11: secuencias de señal de translocación en el RE alternativas

(a) Representación esquemática de constructos de vectores usados para la producción de ivt-ARN. Se clonó el antígeno diana del clon de células T CD4⁺ caracterizado, 3H10 (específico de EBNA-3C, restringido por HLA-DRB1*11:01) en el sistema de vectores pGEM que comprende combinaciones de señales de translocación en el RE de LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 o CD1b humanas (5' con respecto a la secuencia del antígeno) y la secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica de DC-LAMP humana (3' con respecto a la secuencia del antígeno), la secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica de DC-LAMP sola o sin translocación y la secuencia de direccionamiento. Además, se representan las secuencias de aminoácidos de las secuencias de péptido señal empleadas (señales de translocación en el RE) que indican sitios de escisión de peptidasa predichos. (b) Se cultivaron conjuntamente células del clon de células T CD4⁺, 3H10, con CPA transfectadas con especies de ivt-ARN individuales (mLCL). Cultivos conjuntos con CPA transfectadas con simulación sirvieron como controles. Se detectó la secreción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ convencional 16 h después del inicio del cultivo conjunto. Los valores se presentan como la media + DE de triplicados.

Figura 12: presentación simultánea de CMH de clase II y CMH de clase I usando la señal de direccionamiento CrossTag. (a) Representación esquemática de los constructos de vectores usados para la producción de ivt-ARN. Se clonaron los antígenos diana de un clon de células T CD4⁺ caracterizado, 3H10 (específico de EBNA-3C, restringido por HLA-DRB1*11:01) y un clon de células T CD8⁺ caracterizado, IVSB (específico de tirosinasa, restringido por HLA-A2*01:01) en el sistema de vectores pGEM con o sin las secuencias de direccionamiento CrossTag. Se clonó EBNA-3C como un fragmento de 1 kb (aa 421-780) de la secuencia génica completa y contiene el epítipo para el clon 3H10. Para la generación del constructo IVSB-3H10(epítipo)-CrossTag, en lugar de una secuencia de antígeno completa, se clonaron secuencialmente mini-genes que comprenden los epítipos del clon 3H10 (EBNA-3C, aa 628-641, VVRMFMRERQLPQS; SEQ ID NO: 36) y del clon IVSB (tirosinasa, aa 369-377, YMDGTMSQV; SEQ ID NO: 37) en la estructura principal del vector pGEM-CrossTag. Para facilitar la estabilización de especies de ivt-ARN transcritas en el citoplasma, todos los constructos de vectores pGEM portan una cola poli-A que comprende 120 pares de bases de adenina (poli-A120) en 3' del marco de lectura abierto (ORF). (b) Se transfectaron fracciones separadas de DC maduras (mDC) de un donante doble positivo para HLA-A2*01:01 y HLA-DRB1*11:01 con especies de ivt-ARN individuales enumeradas en (a). Siete horas después de la transfección, se cultivaron conjuntamente 1*10⁵ células de las distintas poblaciones de mDC con 1*10⁵ células del clon de células T CD4⁺, 3H10, o del células del clon de células T CD8⁺, IVSB (razón 1:1). Cultivos conjuntos con mDC transfectadas con simulación (H₂O) o células T solas sirvieron como controles. Se detectó la secreción de IFN- γ mediante ELISA de IFN- γ convencional 16 h después del inicio del cultivo conjunto. Los valores se presentan como la media + DE de triplicados.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir la invención con detalle con respecto a algunas de sus realizaciones preferidas, se proporcionan las siguientes definiciones generales.

5 La presente invención, tal como se describe de manera ilustrativa a continuación, puede practicarse de manera adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no dados a conocer específicamente en el presente documento.

10 La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinadas figuras, sin embargo, la invención no se limita a las misma, sino únicamente por las reivindicaciones.

15 Cuando se usa el término "que comprende" en la presente descripción y las reivindicaciones, no excluye otros elementos. Para los fines de la presente invención, se considera que el término "que consiste en" es una realización preferida del término "que se compone de". Si a continuación en el presente documento se define un grupo para comprender al menos un determinado número de realizaciones, también debe entenderse que esto da a conocer un grupo que consiste preferiblemente sólo en estas realizaciones.

20 Cuando se usa un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un sustantivo en singular, por ejemplo, "un", "uno/una" o "el/la", este incluye el plural de ese sustantivo a menos que se indique específicamente algo más.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. Por consiguiente, el término proteína o polipéptido "expresado" comprende, sin limitación, proteínas o polipéptidos intracelulares, transmembrana y secretados.

30 Los términos técnicos se usan por su sentido común. Si se transmite un significado específico a determinados términos, se proporcionarán las definiciones de los términos a continuación en el contexto en el que se usan los términos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar linfocitos T específicos de antígeno humano, que comprende las siguientes etapas:

35 A) expresión de al menos una proteína de fusión, que comprende

- al menos un antígeno o un fragmento del mismo,

40 - una secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) precedente al extremo N-terminal del antígeno, y

- un dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica tras el extremo C-terminal del antígeno,

45 en células presentadoras de antígeno; y

B) exposición de una población de células que comprende linfocitos T a las células presentadoras de antígeno de la etapa A) *in vitro* para activar linfocitos T específicos de antígeno específicos para el antígeno expresado por la célula presentadora de antígeno,

50 en el que la proteína de fusión comprende al menos dos antígenos o fragmentos de los mismos diferentes, en el que el fragmento tiene una longitud de un mínimo de 9 aminoácidos.

55 El fragmento puede ser una secuencia del antígeno que es específica para este antígeno, es decir, que no se produce en otra proteína u otro péptido de un mamífero, especialmente de un ser humano. El fragmento puede ser más corto que la secuencia del antígeno, tal como al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 30%, al menos el 50%, al menos el 70%, al menos el 90% más corto que el antígeno. El fragmento puede tener una longitud de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o más aminoácidos.

60 La proteína de fusión puede comprender al menos tres, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 antígenos o fragmentos de los mismos. La proteína de fusión puede comprender menos de 100, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10 antígenos o fragmentos de los mismos.

65 El término "activar linfocitos T específicos de antígeno" se refiere a la activación de células T indiferenciadas (inducción *de novo*) y a la activación de linfocitos T de memoria (reactivación).

Normalmente, las células presentadoras de antígeno y la población de células que comprende linfocitos T son del mismo donante. Además, se contemplan configuraciones alorstringidas tal como se describen en el documento EP1910521, en las que un ácido nucleico que codifica para una molécula de CMH se expresa en las células presentadoras de antígeno del donante que no porta el gen de CMH correspondiente a dicha molécula de CMH que se transfiere.

La expresión de la al menos una proteína de fusión en la etapa A) puede ser expresión transitoria o expresión estable. En realizaciones preferidas, la expresión es expresión transitoria, por ejemplo, mediante la introducción de ivt-ARN que codifica para la al menos una proteína de fusión. La expresión de ivt-ARN tiene la ventaja de que puede producirse rápidamente ivt-ARN de calidad controlada y que no porta ningún contaminante proteico inmunogénico.

Mediante la exposición de los linfocitos T, también denominada sensibilización, surgen varias poblaciones de linfocitos activados diferentes *in vitro*. Normalmente, la exposición en la etapa B) es cultivar conjuntamente las células presentadoras de antígeno con una población de células que comprende linfocitos T. Se activan las células T que reconocen los complejos de CMH:epítipo de las células presentadoras de antígeno, una fracción de las cuales son específicas para los complejos de moléculas de CMH que presentan un epítipo del antígeno expresado en la etapa A). Estas células T buscadas deben separarse de las células T que reconocen moléculas de CMH independientemente del péptido o moléculas de CMH que presentan epítopos que no se derivan del antígeno expresado en la etapa A).

Para la exposición de las células presentadoras de antígeno en la etapa B), las células presentadoras de antígeno se añaden a una población que comprende linfocitos T al menos una vez. La primera adición de las células presentadoras de antígeno también se denomina sensibilización. Las células presentadoras de antígeno pueden añadirse varias veces, por ejemplo, al menos dos veces o al menos tres veces. La segunda adición y cada adición posterior de células presentadoras de antígeno también se denomina reestimulación, ya que en estas etapas los linfocitos T ya activados reciben un estímulo adicional para su posterior proliferación. En determinadas realizaciones, las células presentadoras de antígeno se añaden una vez. En otras realizaciones, las células presentadoras de antígeno se añaden dos veces. En otra realización, las células presentadoras de antígeno se añaden tres veces. Realizaciones adicionales se refieren a métodos en los que las células presentadoras de antígeno se añaden tres o más veces. Las nuevas CPA pueden añadirse a los cultivos de células T cada de 7 a 21 días, o cada de 12 a 16 días, o cada de 13 a 15 días, o cada 14 días. El experto entiende que las células se proporcionan con medio de cultivo nuevo de forma regular que contiene citocinas complementarias.

La exposición de la población de células que comprende linfocitos T a las células presentadoras de antígeno *in vitro* significa que la exposición no se produce en un organismo, tal como un mamífero, sino que la exposición tiene lugar en un cultivo de células *in vitro*. El experto conoce las condiciones del cultivo de células y comprenden la adición de citocinas, por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-7 y/o IL-15, entre otras, dependiendo del tipo de célula T que se genere (Schendel, DJ. *et al.* Human CD8+ T lymphocytes. 1997. En: The Immunology Methods Manual. (I. Lefkovits, Ed.) págs. 670-690.; Regn, S., *et al.* 2001. The generation of monospecific y bispecific antiviral cytotoxic T lymphocytes (CTL) for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic bone marrow transplant. Bone Marrow Transplant. 27: 53-64; Su, Z. *et al.* Antigen presenting cells transfected with LMP2a RNA induce CD4+ LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes which kill via a Fas-independent mechanism. Leuk. Lymphoma 43(8): 1651-62.).

En algunas realizaciones, el método puede comprender además la etapa de enriquecimiento de linfocitos T activados y/o específicos de antígeno. Esta etapa de enriquecimiento comprende normalmente las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con al menos una molécula de unión que se une específicamente a una proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados o con al menos una molécula de CMH que presenta un epítipo del antígeno deseado;

(b) aislar linfocitos T a los que se une la al menos una molécula de unión o la al menos una molécula de CMH que presenta un epítipo del antígeno deseado.

En realizaciones particulares, el método puede comprender la etapa de enriquecimiento de linfocitos T activados. Esta etapa de enriquecimiento comprende normalmente las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con al menos una molécula de unión que se une específicamente a una proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados;

(b) aislar linfocitos T a los que se une la al menos una molécula de unión.

En otras realizaciones específicas, el método puede comprender la etapa de enriquecimiento de linfocitos T que son específicos para el antígeno deseado. Esta etapa de enriquecimiento comprende normalmente las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con una molécula de CMH que presenta un epítipo del antígeno deseado;

(b) aislar linfocitos T a los que se une la al menos una molécula de CMH que presenta un epítipo del antígeno deseado.

El enriquecimiento de linfocitos T activados basado en proteínas marcadoras expresadas específicamente por linfocitos T activados permite el enriquecimiento de un amplio espectro de células T activadas independientemente de la restricción y del epítipo específico. La molécula de unión que se une específicamente a la proteína marcadora puede ser, sin limitación, un anticuerpo, un derivado de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o un conjugado de los mencionados anteriormente con un molécula adicional. La proteína de unión puede marcarse, por ejemplo, para facilitar los procedimientos de clasificación, tales como FACS o MACS.

La proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados puede ser cualquier proteína de superficie o proteína secretada que se exprese por linfocitos T activados y que no se exprese sustancialmente por linfocitos T inactivados. En realizaciones preferidas, la al menos una proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados se selecciona del grupo que comprende Ox40, CD137, CD40L, PD-1, receptor de IL-2, interferón- γ , IL-2, GM-CSF y TNF- α . El uso de estos marcadores permite el enriquecimiento de linfocitos T activados independientemente del epítipo específico presentado por el TCR. Este método facilita el aislamiento de células T que reconocen todos los epítopos inmunogénicos potenciales de un antígeno seleccionado y, por ejemplo, es particularmente útil para antígenos escasamente definidos.

En la etapa de enriquecimiento, las células seleccionadas pueden agruparse en subpoblaciones o aislarse directamente como clones celulares individuales. En realizaciones específicas, las células se agrupan en una primera etapa de enriquecimiento y se separan en una etapa de enriquecimiento adicional en clones individuales. La separación de clones individuales puede producirse, sin limitación, mediante dilución limitada o clasificación automatizada de células individuales empleando FACS o MACS. Preferiblemente, la clasificación de células individuales se lleva a cabo mediante FACS.

En realizaciones específicas, la selección de células T CD4 activadas comprende las siguientes etapas:

(a1) poner en contacto las células presentadoras de antígeno que expresan al menos una proteína de fusión de la etapa A) con un anticuerpo contra CD40 para bloquear la interacción entre CD40-CD40L de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T específicos de antígeno y acumular CD40L en la superficie de los linfocitos T;

(a2) poner en contacto la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con un anticuerpo anti-CD40L;

(b) aislar los linfocitos T marcados con un anticuerpo anti-CD40L y un anticuerpo anti-CD4.

Con el fin de emplear la selección de células T activadas por proteínas secretadas, por ejemplo, citocinas como interferón- γ , moléculas biespecíficas que reconocen marcadores de superficie de células T y citocinas dirigidas capturan la citocina secretada en la superficie celular, que luego puede detectarse mediante un anticuerpo de detección marcado tal como se describe en Becker *et al.* (Becker, C *et al.* 2001. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN capture assay. *Nature Med.* 7(10): 1159-1162.).

Además, en la etapa (a), las células pueden ponerse en contacto además con una molécula de unión que se une específicamente a CD4 y/o con una molécula de unión que se une específicamente a CD8.

Alternativamente, el enriquecimiento puede llevarse a cabo empleando moléculas de CMH que presentan un epítipo del antígeno deseado (es decir, el antígeno expresado de manera exógena por la célula presentadora de antígeno de la etapa A). Las moléculas de CMH pueden marcarse, por ejemplo, para facilitar los procedimientos de clasificación, tales como FACS o MACS. La interacción de baja afinidad entre el TCR y los complejos de péptido:CMH correspondientes puede superarse mediante el ensamblaje de multímeros solubles de péptido:moléculas de CMH tal como se describe en Wilde *et al.* (Dendritic cells pulsed with RNA encoding allogeneic MHC and antigen induce T cells with superior antitumor activity and higher TCR functional avidity. *Blood* 114(10): 2131-2139; 2009), tales como, sin limitación, dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros, hexámeros, heptámeros u octámeros. Además, pueden emplearse los denominados estreptámeros de péptido:CMH que se unen de manera reversible a los TCR y, por tanto, permiten el aislamiento de TCR de alta

afinidad sin el riesgo de inducir cambios funcionales ni la muerte celular inducida por activación (Knabel *et al.* (2002) Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nature Medicine*, 8(6), 631-7.). Las propiedades reversibles de la interacción entre célula T:estreptámero se basan en una forma modificada de estreptavidina (Strep-Tactin) que actúa como la cadena principal del estreptámero.

Este enfoque permite el enriquecimiento dirigido de TCR específicos de epítipo con una restricción específica.

El aislamiento de los linfocitos T activados y/o específicos de antígeno puede llevarse a cabo mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), así como clasificación celular activada por de forma magnética (MACS). Para FACS, la molécula de unión que se une específicamente a la proteína marcadora o la molécula de CMH que presenta un epítipo del antígeno deseado se marca con un colorante fluorescente. FACS es particularmente útil para el aislamiento de números pequeños con alta pureza. Para MACS, la molécula de unión que se une específicamente a la proteína marcadora o la molécula de CMH que presenta un epítipo del antígeno deseado se marca con una partícula magnética, tal como una perla magnética. MACS es particularmente adecuada para la rápida clasificación de cultivos en masa.

Además, en la etapa (a), las células pueden ponerse en contacto además con una molécula de unión que se une específicamente a CD4 para enriquecerse adicionalmente en CD4 y/o con una molécula de unión que se une específicamente a CD8.

Otra realización se refiere al método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además la etapa C2) identificación de linfocitos T específicos de antígeno, que comprende las siguientes etapas:

a) incubación de clones celulares expandidos de la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con

(i) células presentadoras de antígeno tal como se define en la etapa A), y

(ii) células presentadoras de antígeno de control;

b) comparación del perfil de activación de la incubación con (i) y (ii) para cada clon celular;

c) identificación de clones celulares específicos de antígeno basándose en la comparación de b); en el que la activación mediante (i), pero no mediante (ii), indica que el clon celular es específico de antígeno.

La etapa C2) identificación de linfocitos T específicos de antígeno puede llevarse a cabo después de la etapa C1) enriquecimiento de linfocitos T activados, o alternativamente puede llevarse a cabo después de la etapa B) exposición de la población de células que comprende linfocitos T a las células presentadoras de antígeno sin la etapa de enriquecimiento C1).

Una realización adicional se refiere al método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además la etapa C2) identificación de linfocitos T específicos de antígeno, que comprende las siguientes etapas:

a) incubación de al menos una fracción de células de la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con

(i) células presentadoras de antígeno tal como se define en la etapa A), y

(ii) células presentadoras de antígeno de control o en ausencia de células presentadoras de antígeno;

b) comparación del perfil de activación de la incubación con (i) y (ii) para la al menos una fracción de células;

c) identificación de una fracción de células que es específica de antígeno basándose en la comparación de b);

en el que la activación mediante (i), pero no mediante (ii), indica que la fracción de células es específica de antígeno.

Otra realización se refiere al método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además la etapa C2) identificación de linfocitos T específicos de antígeno, que comprende las siguientes etapas:

a) incubación de clones de células T expandidos de la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con

(i) células presentadoras de antígeno tal como se define en la etapa A), y

(ii) células presentadoras de antígeno de control o en ausencia de células presentadoras de antígeno;

b) comparación del perfil de activación de la incubación con (i) y (ii) para cada clon celular;

c) identificación de clones celulares específicos de antígeno basándose en la comparación de b);

en el que la activación mediante (i), pero no mediante (ii), indica que el clon celular es específico de antígeno.

El perfil de activación de los linfocitos T puede determinarse, por ejemplo, midiendo la liberación de citocinas inducida por activación o la capacidad de destrucción dirigida por antígeno.

Para medir la secreción de citocinas inducida por activación, las células T pueden cultivarse conjuntamente con CPA cargadas con antígeno. Pueden emplearse diferentes razones de célula efectora con respecto a célula diana (E:T). Pueden usarse células T incubadas con células presentadoras de antígeno de control, es decir, CPA transfectadas con simulación, o en ausencia de células estimulantes como controles negativos. Los sobrenadantes de cultivo se evalúan mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) convencional. Los ejemplos de marcadores son, sin limitación, la secreción de factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), IL-2 y TNF- α . La secreción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α tras el encuentro con el antígeno se correlaciona con una función antitumoral potenciada y, por tanto, es particularmente útil cuando se mide la secreción de citocinas inducida por antígenos de células T citotóxicas CD8⁺. Además, IFN- γ y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) son citocinas bien definidas para la evaluación de clones de células T polarizadas con células T cooperadoras 1 (Th1) CD4⁺ específicos de antígeno.

Si se usan múltiples antígenos de manera simultánea para la inducción de células T primarias, pueden mezclarse poblaciones de CPA individuales que expresen cada antígeno de sensibilización en proporciones iguales y usarse en cultivos conjuntos de células T. Por tanto, Los ensayos de selección iniciales realizados para evaluar únicamente la especificidad permiten la predicción de la reactividad al antígeno global con respecto a los antígenos diana desplegados totales. La evaluación de las especificidades de antígeno individuales requiere el posterior cultivo conjunto de células T reactivas al antígeno con CPA transfectadas con ivt-ARN de especies individuales.

Además, la actividad citotóxica de los clones de células T individuales puede medirse, por ejemplo, mediante ensayos de liberación de cromo. En tales ensayos, se marcan las células diana con cromo radiactivo y se exponen a células T. Tras la destrucción, se libera el cromo radiactivo en el sobrenadante y puede detectarse en el plazo de 4 horas después del inicio del cultivo conjunto. La liberación específica de cromo está normalizada con respecto a la liberación espontánea evaluada mediante la incubación de células diana en ausencia de células efectoras. Por consiguiente, altas cantidades de cromo en el sobrenadante se correlacionan con una excelente actividad citolítica de células T. Los ensayos de liberación de cromo se realizan preferiblemente para seleccionar células T CD8⁺ específicas de antígeno tumoral.

Las células presentadoras de antígeno adecuadas para su uso en la identificación de linfocitos T específicos de antígeno pueden ser, por ejemplo, líneas de células tumorales que expresan el antígeno deseado y las moléculas de CMH requeridas, líneas de células presentadoras de antígeno establecidas que expresan moléculas de CMH habituales o células presentadoras de antígeno derivadas del mismo donante que la población que comprende linfocitos T.

Un ejemplo de una línea de células presentadoras de antígeno establecida es la línea celular T2 linfoidea humana que expresa el frecuente alelo HLA-A*02:01, que muestra presentación de epítipo intrínseca defectuosa y puede cargarse de forma externa con péptidos cortos, por ejemplo, péptidos sintéticos. Esta línea celular puede usarse para la selección de linfocitos T CD8⁺ restringidos por HLA-A*02:01. Otro ejemplo es la línea celular K562 humana, que carece de expresión de HLA de clase I y II, en la que cualquier molécula de HLA de interés puede introducirse de manera estable o transitoria y, por tanto, puede servir tanto para la selección de linfocitos T CD8⁺ como de linfocitos T CD4⁺.

Las células presentadoras de antígeno derivadas del donante pueden ser, por ejemplo, monocitos aislados que maduran para formar células dendríticas. Las células dendríticas maduras muestra una óptima capacidad de activación.

Un ejemplo adicional para CPA derivadas del donante útiles son linfocitos B inmortalizados con virus de Epstein-Barr (VEB), denominados líneas celulares linfoblastoideas (LCL). Dado que las LCL se originan de manera

natural a partir de células B, estas CPA presentan un función competente en el procesamiento y la presentación de antígenos. Además, las LCL expresan moléculas coestimuladoras como B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), así como moléculas de adhesión apropiadas que ayudan a potenciar su capacidad estimuladora. Pueden usarse cepas de VEB mutante con genoma reducido (mini-VEB) para generar células B transformadas con mini-VEB (mLCL) que carecen de la mayoría de los genes del ciclo lítico que, por consiguiente, reducen la activación dependiente de VEB de linfocitos T (Kempkes, B.*et al.* (1995) *Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA*. *J Virol* 69(1): 231-238., 1995; Moosmann, *et al.* (2002) *B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells*. *Blood* 100(5): 1755-1764).

Pueden usarse LCL derivadas de donante/mLCL para evaluar la especificidad de células T, particularmente cuando es necesario evaluar grandes números de clones de células T aislados. La carga con antígeno de LCL/mLCL puede lograrse, por ejemplo, mediante transducción retroviral, de transfección *in vitro*-ARN y suministro externo de péptidos o proteínas.

El aislamiento de los linfocitos T específicos de antígeno se basa en la comparación del perfil de activación de los linfocitos T incubados (i) con células presentadoras de antígeno que expresan el antígeno deseado y (ii) con células presentadoras de antígeno de control o en ausencia de células presentadoras de antígeno.

La activación mediante (i) células presentadoras de antígeno que expresan el antígeno deseado, y no mediante (ii) células presentadoras de antígeno de control o en ausencia de células presentadoras de antígeno, indica que el clon de células T es específico de antígeno. Activado en comparación con inactivado significa que existe una reducción de al menos el 30%, de al menos el 40%, de al menos el 50%, de al menos el 60%, de un mínimo del 70%, de al menos el 80% del valor (es decir, la secreción de IFN- γ) de los linfocitos T incubados con células presentadoras de antígeno que expresan el antígeno deseado.

La secuencia señal de translocación en el RE puede derivarse de una proteína asociada endosómica/lisosómica.

La secuencia señal de translocación en el RE usada en el método dado a conocer puede ser la secuencia de clasificación de una proteína ubicada endosómica/lisosómica. Las proteínas ubicadas endosómicas/lisosómicas, tal como se usa en el presente documento, se refieren a proteínas que se ubican en la membrana o la luz de los endosomas y/o los lisosomas de una célula.

Los ejemplos de proteínas ubicadas endosómicas o lisosómicas son glicosidasas tales como, alfa-galactosidasa A/GLA, endo-beta-N-acetilglucosaminidasa H/Endo H, alfa-N-acetilgalactosaminidasa/NAGA, galactosilceramidasa/GALC, alfa-N-acetilglucosaminidasa/NAGLU, glucosilceramidasa/GBA, alfa-galactosidasa/a-Gal, heparanasa/HPSE, alfa-L-fucosidasa, heparinasa I, alfa-L-fucosidasa tisular/FUCAI, heparinasa II, beta-galactosidasa-1/GLB1, heparinasa III, beta-glucuronidasa/GUSB, hexosaminidasa A/HEXA, beta (1-3)-galactosidasa, hialuronato liasa, beta (1-4)-galactosidasa, hialuronidasa 1/HYAL1, quitinasa 1 similar a 3, hialuronidasa 4/HYAL4, quitinasa 2 similar a 3, alfa-L-iduronidasa/IDUA, quitinasa 3 similar a 3/ECF-L, quitobiasa/CTBS, quitotriosidasa/CHIT1, proteína similar a lactasa/LCTL, condroitina B liasa/condroitinasa B, alfa-glucosidasa lisosómica, condroitinasa ABC, MBD4, condroitinasa AC, NEU-1/sialidasa-1, beta-glucosidasa citosólica/GBA3, O-GlcNAcase/OGA, endo-beta-N-acetilglucosaminidasa F1/Endo F1, PNGasa F, endo-beta-N-acetilglucosaminidasa F3/Endo F3, SPAM1; proteasas lisosómicas tales como, AMSH/STAMPB, cathepsina H, cathepsina 3, cathepsina K, cathepsina 6, cathepsina L, cathepsina 7/cathepsina 1, cathepsina O, cathepsina A/carboxipeptidasa A lisosómica, cathepsina S, cathepsina B, cathepsina V, cathepsina C/DPPI, cathepsina X/Z/P, cathepsina D, galactosilceramidasa/GALC, cathepsina F, oegumaína/asparaginilendopeptidasa; sulfatasas tales como arilsulfatasa A/ARSA, iduronato 2-sulfatasa/IDS, arilsulfatasa B/ARSB, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa/GALNSv, arilsulfatasa G/ARSG, sulfamidasa/SGSH, glucosamina (N-acetil)-6-sulfatasa/GNS, sulfatasa-2/SULF2; u otras proteínas lisosómicas tales como BAD-LAMP/LAMP5; hialuronidasa 1/HYAL1; CD63; LAMP1/CD107a; CD-M6PR; LAMP2/CD107b; cadena pesada 1 de clatrina/CHC17; Rab27a; cadena pesada 2 de clatrina/CHC22; UNC13D, CD68, CD1b o DC-LAMP.

La secuencia señal de translocación en el RE se deriva de una proteína asociada endosómica/lisosómica. La proteína asociada endosómica/lisosómica puede ser LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 o CD1b, preferiblemente LAMP1. Preferiblemente, la señal de translocación en el RE es humana. La secuencia señal de translocación en el RE puede comprender la secuencia de al menos una de SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 46. En algunas realizaciones, la secuencia señal de translocación en el RE puede consistir en una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47. En realizaciones específicas, la secuencia señal de translocación en el RE comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o un fragmento de la misma. En realizaciones más específicas, la secuencia señal de translocación en el RE consiste en la siguiente secuencia SEQ ID NO: 34.

La secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede derivarse de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP. La secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es normalmente una parte

de un dominio transmembrana y citoplásmico. Por tanto, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede derivarse de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP. Preferiblemente, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es humano. Normalmente, la secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica comprende el motivo Y-XX seguido por un aminoácido hidrófobo. Preferiblemente, la secuencia señal de direccionamiento endosómica/lisosómica es YQRI. El dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 54 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 35 o un fragmento de la misma.

Un experto conoce bien el término aminoácido hidrófobo. Los ejemplos de aminoácidos hidrófobos son Ala, Ile, Leu, Phe, Val, Pro, Gly, Met, Trp, Tyr, Pro, Cys.

Normalmente, las células presentadoras de antígeno se seleccionan de células dendríticas, células B activadas, monocitos, macrófagos, líneas celulares linfoblastoideas transformadas con VEB, preferiblemente células dendríticas, más preferiblemente células dendríticas derivadas de monocitos.

Las células presentadoras de antígeno pueden comprender diferentes poblaciones de células presentadoras de antígeno, expresando cada población una proteína de fusión de antígeno diferente.

En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas maduras generadas mediante un método que comprende las siguientes etapas: i) suministro de monocitos; ii) incubación de los monocitos de la etapa i) con IL-4 y GM-CSF; iii) incubación de los monocitos de la etapa ii) con IL-4 y GM-CSF en combinación con un cóctel de maduración. El cóctel de maduración puede comprender al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que consiste en IL- β , TNF- α , INF- γ , agonista de TLR7/8, PGE2 y agonista de TLR3, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el agonista de TLR7/8 puede ser R848 y/o el agonista de TLR3 puede ser poli(I:C). La incubación de la etapa ii) puede durar al menos 2 días. La incubación de la etapa iii) puede durar al menos 12 horas, preferiblemente 24 horas.

Habitualmente, la población de células que comprende linfocitos T es una población de linfocitos de sangre periférica. La población de células que comprende linfocitos T puede ser una población de linfocitos de sangre periférica sin separar. La población de células puede estar enriquecida en linfocitos T, preferiblemente linfocitos T CD8+ y/o CD4+.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un vector de expresión, que comprende:

- una secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) humana, y

- un dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica,

- una secuencia que codifica para al menos dos antígenos diferentes, o fragmentos de los mismos, que se inserta entre la secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) humana y el dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica;

en el que cada uno de los fragmentos tiene una longitud de un mínimo de 9 aminoácidos.

El vector puede comprender un promotor para la transcripción de ARNm *in vitro*. La secuencia señal de translocación en el RE se deriva de una proteína asociada endosómica/lisosómica, por ejemplo, LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68, CD1b, preferiblemente LAMP1. Preferiblemente, la señal de translocación en el RE es humana. En realizaciones específicas, la señal de translocación en el RE comprende la secuencia SEQ ID NO: 33 o un fragmento de la misma. En realizaciones más específicas, la señal de translocación en el RE consiste en la siguiente secuencia SEQ ID NO: 34.

La secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede derivarse de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP. La secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es normalmente una parte de un dominio transmembrana y citoplásmico. Por tanto, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede derivarse de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP. Preferiblemente, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es humano.

Normalmente, la secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica comprende el motivo Y-XX seguido por un aminoácido hidrófobo (X representa cualquier aminoácido natural). Preferiblemente, la señal de direccionamiento endosómica/lisosómica es YQRI. El dominio transmembrana y citoplásmico que comprende

una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 54 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 35 o un fragmento de la misma.

5

En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende además sitios de restricción entre la señal de translocación en el RE y el dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica. En otras realizaciones, el vector comprende además al menos un antígeno, o un fragmento del mismo, que se inserta entre la señal de translocación en el retículo endoplásmico

10

RE humana y el dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica.

El vector puede comprender una secuencia que codifica para al menos tres, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 antígenos o fragmentos de los mismos. El vector puede

15

comprender una secuencia que codifica para menos de 100, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10 antígenos o fragmentos de los mismos.

En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de longitud completa de un antígeno. Alternativamente, el vector comprende un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos de un antígeno. Tal como se muestra en la figura 12, células presentadoras de antígeno en las que se ha introducido un vector que comprende fragmentos de dos antígenos diferentes pueden inducir la activación de TCR específicos diferentes para los dos antígenos.

20

25

Normalmente, el antígeno es un antígeno tumoral o un antígeno viral. El antígeno tumoral puede seleccionarse del grupo que consiste en antígeno tumoral viral, antígeno específico de tumor, antígeno asociado al tumor y un antígeno que porta mutaciones específicas del paciente y que se expresa en células tumorales del paciente.

30

Los antígenos tumorales virales, que también se denominan antígenos virales oncogénicos, son antígenos de virus oncogénicos, tales como los virus oncogénicos del ADN, por ejemplo, virus tales como el virus de la hepatitis B, el virus del herpes y el virus del papiloma, y virus oncogénicos del ARN. Los antígenos específicos de tumor se refieren a mutaciones asociadas al tumor que se expresan exclusivamente por células tumorales. El grupo de antígenos asociados al tumor comprende, por ejemplo, antígenos de cáncer de testículo específicos de tejido o antígenos de diferenciación de tejido tales como MART-1, tirosinasa o CD20. Preferiblemente, el antígeno tumoral es un antígeno asociado al tumor, más preferiblemente el antígeno asociado al tumor es un antígeno de cáncer de testículo (antígeno C/T). El antígeno C/T puede seleccionarse del grupo que comprende miembros de la familia MAGE, por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, pero sin limitarse a los mismos, antígenos tumorales que comprenden mutaciones puntuales, NY-ESO1, antígeno de tumor de testículo 1B, GAGE-1, SSX-4, XAGE-1, BAGE, GAGE, SCP-1, SSX-2, SSX-4, CTZ9, CT10, SAGE y CAGE. Preferiblemente,

35

40

el antígeno C/T puede seleccionarse del grupo que consiste en GAGE-1, SSX-4 y XAGE-1. Preferiblemente, el antígeno que porta mutaciones específicas del paciente y que se expresa en células tumorales del paciente no se expresa en células no cancerosas del paciente.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, que expresa al menos una proteína de fusión que comprende

45

- al menos un antígeno o un fragmento del mismo,

50

- una secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) precedente al extremo N-terminal del antígeno, y

- un dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica tras el extremo C-terminal del antígeno.

55

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del vector de expresión, tal como se describe en el presente documento, para la generación *in vitro* de linfocitos T específicos de antígeno.

60

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a T-linfocitos para su uso en un método de prevención o tratamiento de cáncer, que comprende administrar a un mamífero los linfocitos T generados mediante los métodos tal como se describen en el presente documento.

Otro aspecto se refiere a un método para generar un TCR específico de antígeno que comprende las etapas de los métodos descritos anteriormente y que comprende además la etapa de aislar un TCR a partir del linfocito específico de antígeno activado generado mediante los métodos tal como se describen en el presente documento. El aislamiento del TCR y el posterior análisis de la secuencia se describe, por ejemplo, en Steinle *et al.* (*In vivo* expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for

65

maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. The Journal of Experimental Medicine, 181(2), 503-13; 1995). El análisis de la secuencia puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante PCR o mediante métodos de secuenciación de la siguiente generación. Los expertos en la técnica conocen bien métodos para identificar la secuencia de un ácido nucleico.

5

El TCR se compone de dos cadenas de proteína diferentes, α y β . La cadena α de TCR comprende las regiones variable (V), de unión (J) y constante (C). La cadena α de TCR comprende las regiones variable (V), de diversidad (D), de unión (J) y constante (C). Las regiones V(D)J reorganizadas tanto de la cadena α de TCR como de la cadena β de TCR contienen regiones hipervariables (CDR, regiones determinantes de complementariedad), entre las que la región CDR3 determina el reconocimiento específico del epítipo.

10

Un aspecto de la invención se refiere a un TCR específico para GAGE-1. En una realización, el TCR específico para GAGE-1 reconoce específicamente al menos una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO:49, o fragmentos de las mismas. El fragmento puede tener una longitud de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o más aminoácidos. El TCR puede unirse específicamente a al menos una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO:49, o fragmentos de las mismas.

15

El TCR específico para GAGE-1 puede comprender una cadena α de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 7 y una cadena β de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 8.

20

25

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para GAGE-1 que comprende una cadena α de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una cadena β de TCR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

30

Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para GAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

- la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 7 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3;

35

- la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 8 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4.

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para GAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

40

- la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 7 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3;

45

- la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 8 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4.

50

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para GAGE-1 que comprende una cadena α de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 5 y una cadena β de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 6.

55

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para GAGE-1 que comprende una cadena α de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5 y una cadena β de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.

60

Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para GAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

65

- la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 5 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1;

5

- la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 6 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

10 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para GAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

15 - la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 5 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1;

20 - la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 6 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

25 Otro aspecto de la solicitud se refiere a un TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 15 y una cadena β de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 16.

30

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena β de TCR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

35 Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

40 - la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 15 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11;

- la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 16 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12.

45 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

50 - la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 15 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11;

55 - la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 16 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12.

60 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 13 y una cadena β de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 14.

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 13 y una cadena β de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 14.

5 Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

10 - la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 13 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9;

15 - la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 14 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10.

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para SSX-4 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

20 - la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 13 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 9;

25 - la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 14 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 10.

30 Un aspecto de la divulgación se refiere a un TCR específico para XAGE-1. En una realización, el TCR específico para XAGE-1 reconoce específicamente al menos una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51, o fragmentos de las mismas. El fragmento puede tener una longitud de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o más aminoácidos. El TCR puede unirse específicamente a al menos una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51, o fragmentos de las mismas.

35 El TCR específico para XAGE-1 puede comprender una cadena α de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 23 y una cadena β de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 24.

40 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una cadena β de TCR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

45 Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

50 - la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 23 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19;

55 - la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 24 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 20.

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

60 - la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 23 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19;

- la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%,

al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 24 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 20.

- 5 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 21 y una cadena β de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 22.

- 15 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 21 y una cadena β de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 22.

Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

- 20 - la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 21 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 17;
- 25 - la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 22 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 18.

- 30 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

- 35 - la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 21 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 17;
- 40 - la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 22 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 18.

- 45 Otro aspecto de la solicitud se refiere a un TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 31 y una cadena β de TCR que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 32.

- 50 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena β de TCR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

- 55 Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

- 60 - la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 31 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 27;
- la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 32 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 28.

- 65 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

- la cadena α de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el

60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 31 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 27;

- 5 - la cadena β de TCR comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 32 y comprende una CDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 28.

- 10 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 29 y una cadena β de TCR codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 30.

- 15 Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 29 y una cadena β de TCR codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 30.

Además, la solicitud se refiere a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

- 25 - la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 29 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 25;

- 30 - la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 30 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 26.

Determinadas realizaciones se refieren a un receptor TCR específico para XAGE-1 que comprende una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en el que

- 35 - la cadena α de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 29 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 25;

- 40 - la cadena β de TCR está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 30 y comprende una región CDR3 codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 26.

- 45 La presente solicitud también se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican para los TCR tal como se definieron anteriormente.

- 50 Los cambios útiles en la secuencia de ácido nucleico global pueden ser para la optimización de codones. Pueden realizarse alteraciones que conduzcan a sustituciones conservadoras dentro de la secuencia de aminoácidos expresada. Estas variaciones pueden realizarse en regiones determinantes de complementariedad y no determinantes de complementariedad de la secuencia de aminoácidos de la cadena de TCR que no afectan a la función. Habitualmente, no deben realizarse adiciones ni deleciones en la región CDR3.

- 55 El experto en la técnica entiende el concepto de "sustituciones conservadoras de aminoácido" y, preferiblemente, significa que los codones que codifican para residuos con carga positiva (H, K y R) se sustituyen por codones que codifican para residuos con carga positiva, los codones que codifican para residuos con carga negativa (D y E) se sustituyen por codones que codifican para con residuos carga negativa, los codones que codifican para residuos polares neutros (C, G, N, Q, S, T e Y) se sustituyen por codones que codifican para residuos polares neutros y los codones que codifican para residuos apolares neutros (A, F, I, L, M, P, V y W) se sustituyen por codones que codifican para residuos apolares neutros. Estas variaciones pueden producirse de manera espontánea, introducirse mediante mutagénesis al azar o introducirse mediante mutagénesis dirigida. Estos cambios pueden realizarse sin destruir las características esenciales de estos polipéptidos. El experto habitual en la técnica puede seleccionar fácilmente y de manera rutinaria aminoácidos variantes y/o los ácidos nucleicos que codifican para los mismos para determinar si estas variaciones reducen o destruyen sustancialmente la

capacidad de unión al ligando mediante métodos conocidos en la técnica.

Las etiquetas de epítipo son tramos cortos de aminoácidos en los que puede generarse un anticuerpo específico que, en algunas realizaciones, permite identificar específicamente y rastrear la proteína etiquetada que se ha añadido a un organismo vivo o a células cultivadas. La detección de la molécula etiquetada puede lograrse usando varias técnicas diferentes. Los ejemplos de tales técnicas incluyen: inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, ELISA, inmunotransferencia ("Western") y cromatografía de afinidad. Las etiquetas de epítipo añaden un epítipo conocido (sitio de unión a anticuerpo) en la proteína sujeto para proporcionar la unión de un anticuerpo conocido y, a menudo, de alta afinidad, y permitiendo de ese modo identificar específicamente y rastrear la proteína etiquetada que se ha añadido a un organismo vivo o a células cultivadas.

En el contexto de la presente invención, una proteína de fusión de cadena α y/o β de TCR "funcional" significará un TCR o una variante de TCR, por ejemplo, modificado mediante la adición, delección o sustitución de aminoácidos, que mantiene al menos una actividad biológica sustancial. En el caso de la cadena α y/o β de un TCR, esto significará que ambas cadenas siguen siendo capaces de formar un receptor de células T (o bien con una cadena α y/o β no modificada o bien con otra cadena α y/o β de una proteína de fusión de la invención) que ejerce su función biológica, en particular la unión al complejo de péptido-CMH específico de dicho TCR y/o la transducción de señales funcionales tras la interacción específica entre péptido:CMH.

En realizaciones específicas, el TCR puede modificarse para ser una proteína de fusión de cadena α y/o β de receptor de células T (TCR) funcional, en el que dicha etiqueta de epítipo tiene una longitud de entre 6 y 15 aminoácidos, preferiblemente de 9 a 11 aminoácidos. En otra realización, el TCR puede modificarse para ser una proteína de fusión de cadena α y/o β de receptor de células T (TCR) funcional, en el que dicha proteína de fusión de cadena α y/o β de receptor de células T (TCR) comprende dos o más etiquetas de epítipo, o bien espaciadas entre sí o bien directamente en tándem. Las realizaciones de la proteína de fusión pueden contener 2, 3, 4, 5 o incluso más etiquetas de epítipo, siempre que la proteína de fusión mantenga su(s) actividad(es) biológica(s) ("funcional(es)").

Se prefiere una proteína de fusión de cadena α y/o β de receptor de células T (TCR) funcional según la presente invención, en la que dicho etiqueta de epítipo se selecciona de, pero sin limitarse a, etiquetas CD20 o Her2/neu u otras etiquetas convencionales tales como etiqueta myc, etiqueta FLAG, etiqueta T7, etiqueta HA (hemaglutinina), etiqueta His, etiqueta S, etiqueta GST o etiqueta GFP. Las etiquetas myc, T7, GST, GFP son epítopos derivados de moléculas existentes. En cambio, FLAG es una etiqueta de epítipo sintético diseñada por su alta antigenicidad (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.703.004 y 4.851.341). La etiqueta myc puede usarse preferiblemente debido a que están disponibles para su uso reactivos de alta calidad para su detección. Las etiquetas de epítipo pueden tener, por supuesto, una o más funciones adicionales, más allá del reconocimiento por un anticuerpo. Las secuencias de estas etiquetas se describen en la bibliografía y el experto en la técnica las conoce bien.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a una célula T que expresa un TCR tal como se definió anteriormente. Además, la divulgación se refiere a un vector que comprende una o más de las secuencias de ácido nucleico que codifican para un TCR tal como se definió anteriormente. El vector es preferiblemente un plásmido, vector lanzadera, fagémido, cósmido, vector de expresión, vector retroviral, vector adenoviral o una partícula y/o un vector que va a usarse en terapia génica.

Un "vector" es cualquier molécula o composición que tiene la capacidad de transportar una secuencia de ácido nucleico a una célula huésped adecuada en la que puede tener lugar la síntesis del polipéptido codificado. Normalmente, y preferiblemente, un vector es un ácido nucleico que se ha diseñado por ingeniería usando técnicas de ADN recombinante que se conocen en la técnica para incorporar una secuencia de ácido nucleico deseada (por ejemplo, un ácido nucleico de la invención). El vector puede comprender ADN o ARN y/o comprender liposomas. El vector puede ser un plásmido, vector lanzadera, fagémido, cósmido, vector de expresión, vector retroviral, vector adenoviral o una partícula y/o un vector que va a usarse en terapia génica. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionable y otros elementos genéticos conocidos por los expertos habituales en la técnica. Un vector es preferiblemente un vector de expresión que incluye un ácido nucleico según la presente invención unido operativamente a secuencias que permiten la expresión de dicho ácido nucleico.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona una célula en la que se ha introducido la secuencia de ácido nucleico anterior que codifica para un TCR tal como se describió anteriormente. En la célula T, puede introducirse el vector descrito anteriormente que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el TCR descrito anteriormente o puede introducirse ARN transcrito *in vitro* que codifica para dicho TCR. La célula puede ser un linfocito de sangre periférica, tal como una célula T. El método de clonación y expresión exógena del TCR se describe, por ejemplo, en Engels *et al.* (Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-

major histocompatibility complex affinity. Cancer Cell, 23(4), 516-26. 2013).

Otro aspecto de la solicitud se refiere a los TCR o a las células que expresan un TCR, tal como se definió anteriormente, para su uso como medicamento. Por tanto, la presente solicitud también contempla una composición farmacéutica que comprende los TCR o las células que expresan un TCR, tal como se describió anteriormente, y un portador farmacéuticamente aceptable. Determinadas realizaciones se refieren a los TCR o a las células que expresan un TCR, tal como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento de una enfermedad que implica células malignas que expresan GAGE-1, SSX-4, XAGE-1 o una mezcla de los mismos. Por tanto, la solicitud también se refiere a los TCR, tal como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento de cáncer. Por consiguiente, la solicitud se refiere a un método de tratamiento de un paciente que necesita terapia celular adoptiva, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una composición farmacéutica tal como se define en el presente documento. El paciente puede padecer enfermedades que implican células malignas que expresan GAGE-1, SSX-4, XAGE-1 o una mezcla de los mismos.

Los componentes activos de la presente invención se usan preferiblemente en una composición farmacéutica de este tipo en dosis mezcladas con un portador o material portador aceptable, para que la enfermedad pueda tratarse o al menos aliviarse. Una composición de este tipo puede incluir (además del componente activo y el portador) material de carga, sales, tampón, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales, que se conocen en el estado de la técnica.

El término "farmacéuticamente aceptable" define un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del componente activo. La elección del portador depende de la aplicación.

La composición farmacéutica puede contener componentes adicionales que potencien la actividad del componente activo o que complementen el tratamiento. Tales componentes y/o factores adicionales pueden formar parte de la composición farmacéutica para lograr efectos sinérgicos o minimizar los efectos adversos o no deseados.

En "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, edición más reciente, se publican técnicas para la formulación o preparación y aplicación/medicación de los componentes activos de la presente invención. Una aplicación apropiada es una aplicación parenteral, por ejemplo, inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraganglionares, intraperitoneales o intratumorales. La inyección intravenosa es el tratamiento preferido de un paciente.

Según una realización preferida, la composición farmacéutica es una infusión o una inyección.

Una composición inyectable es una composición fluida farmacéuticamente aceptable que comprende al menos un principio activo, por ejemplo, una población de células T expandida (por ejemplo, autóloga o alogénica para el paciente que va a tratarse) que expresa un TCR. El principio activo se disuelve o suspende habitualmente en un portador fisiológicamente aceptable, y la composición puede comprender además cantidades menores de una o más sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes emulsionantes, conservantes y agentes reguladores del pH, y similares. Tales composiciones inyectables que son útiles para su uso con las proteínas de fusión de esta divulgación son convencionales; los expertos habituales en la técnica conocen bien las formulaciones apropiadas.

Ejemplos

Validación de la presentación cruzada eficiente de CMH de clase II mediante el vector CrossTA_g

Para obtener la presentación cruzada de CMH de clase II de proteínas codificadas por ARN, se acoplaron secuencias de ADN de antígeno seleccionadas con una señal de direccionamiento de CMH de clase II (CrossTA_g). Con este fin, se fusionó la señal de translocación en el RE de la proteína 1 de membrana asociadas a lisosomas humana (LAMP-1) en 5' con los dominios transmembrana y citoplásmicos de DC-LAMP humana. Se separaron estos dos componentes de señal por sitios de restricción únicos que permiten la integración de secuencias de antígeno seleccionadas en marco con CrossTA_g. El péptido señal LAMP-1 se usó para facilitar la translocación cotraduccional de proteínas recién sintetizadas en el RE. Tras la translocación, la señal de direccionamiento de DC-LAMP citoplásmica (motivo YXX ϕ ; X representa cualquier aminoácido natural; ϕ representa cualquier aminoácido hidrófobo; SEQ ID NO: 38) debe garantizar un transporte eficiente de proteínas al compartimento endosómico/lisosómico.

Se integró una secuencia de codificación parcial del antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA)-3C, que codifica para un fragmento de 1 kb que contiene el epítipo conocido para el clon de células T CD4⁺ específico de EBNA-3C, 3H10 (descrito en Xiaojun Yu, *et al.*: Antigen-armed antibodies targeting B lymphoma cells effectively activate antigen-specific CD4⁺ T cells. Blood 5 de marzo de 2015; 125(10):1601-10.; <http://www.iedb.org/assayId/2445148>) que está restringido por HLA-DRB1*11:01. Se usaron constructos

adicionales que comprendían sólo una o ninguna de las dos señales para evaluar la necesidad de cada secuencia para la presentación cruzada de CMH de clase II deseada (figura 1a). Posteriormente, se transcribió el ARN *in vitro* a partir de plásmidos linealizados y se transfectó en diferentes CPA que expresan el elemento de restricción requerido HLA-DRB1*11:01. La medición de la producción de IFN- γ tras el reconocimiento específico de antígeno por el clon 3H10 permitió la detección de la presentación cruzada eficiente de CMH de clase II de proteína traducida y procesada de manera endógena en experimentos de cultivo conjunto con DC, así como líneas celulares linfoblastoideas (mLCL) transformadas con mini-VEB, transfectadas con EBNA-3C-CrossTag-ARN (figura 1b). Sólo ivt-ARN que contenía la señal de translocación en el RE de LAMP-1 condujo a una activación de células T detectable. En comparación con la presentación de CMH de clase II pronunciada lograda con EBNA-3C-CrossTag-ARN, el péptido señal LAMP-1 solo confirió una menor capacidad de presentación cruzada. Se confirmaron estos datos usando un clon de células T CD4⁺ adicional específico para un epítipo restringido por HLA-DRB1*15:01 del antígeno BNR1 del VEB (datos no mostrados).

A continuación, se usaron células T 3H10 para dilucidar si la señal CrossTag conducía a la presentación de CMH de clase II mediante 1) secreción y recaptación de proteínas o 2) rutas de presentación internas de células. Para esto, se transfectaron DC positivas para HLA-DRB1*11:01 o negativas para HLA-DRB1*11:01 con EBNA-3C-CrossTag-ARN. Se incubaron conjuntamente DC transfectadas y sin transfectar en todas las posibles combinaciones (positivas/negativas para HLA-DRB1*11:01) y después se cultivaron conjuntamente con células 3H10. El reconocimiento de CPA sólo se detectó cuando se transfectaron DC positivas para HLA-DRB1*11:01 con antígeno-CrossTag-ARN. No se detectó el reconocimiento de DC positivas para HLA-DRB1*11:01 sin transfectar que potencialmente hubieran captado y procesado antígeno secretado por DC negativas para HLA-DRB1*11:01 (figura 8).

Expresión de CD40L inducida por antígeno-CrossTag

Para desarrollar un método rápido para el enriquecimiento selectivo de células T CD4⁺ específicas de antígeno, se evaluó la capacidad de DC transfectadas con antígeno-CrossTag-ARN para inducir la expresión de CD40L en células T CD4⁺ con respuesta. Para esto, se tiñeron células T 3H10 con un colorante de rastreo fluorescente y se mezclaron con PBL autólogos hasta concentraciones finales del 10%, el 5%, el 1% o el 0,1% de las células totales (figura 1c). Se cultivaron conjuntamente estas diferentes fracciones con DC autólogas transfectadas con ivt-ARN y EBNA-3C-CrossTag y se tiñeron para la expresión de CD40L. A las 6 h de cultivo conjunto, se detectó una expresión sustancial de CD40L en células 3H10 específicas de EBNA-3C, sin embargo, sólo se observó una expresión marginal de CD40L en PBL autólogos. Incluso a la concentración más baja de células 3H10 (0,1%), la posterior clasificación de células T CD4⁺ positivas para CD40L dio como resultado una población del 66% de células 3H10.

Secuencias de señal de translocación en el RE alternativas

Al medir la producción de IFN- γ tras el reconocimiento específico de antígeno por el clon 3H10, pudo detectarse la presentación cruzada eficiente de CMH de clase II de proteína traducida y procesada de manera endógena en experimentos de cultivo conjunto con CPA, transfectada con diferentes EBNA-3C etiquetados con CrossTag-ARN y diferentes alternativas a CrossTag-ARN (figura 11).

Presentación eficiente de CMH de clase II y CMH de clase I

Se mostró que el uso de la señal CrossTag facilita no sólo la presentación de CMH de clase II, sino también la presentación de CMH de clase I (figura 12).

Presentaciones eficientes de varios antígenos codificados por la misma molécula de ivt-ARNm

Además, pudo establecerse un enfoque eficiente de presentación de varios epítomos procedentes de antígenos diferentes por el mismo ivt-ARNm. Tal como se muestra en la figura 12, las células presentadoras de antígeno que expresan el constructo, que comprende dos epítomos procedentes de antígenos diferentes, activan el clon específico de EBNA-3C, 3H10, así como el clon específico de tirosinasa, IVSB. Por tanto, el constructo ivt que tiene dos epítomos diferentes facilita la presentación de ambos epítomos.

Activación de PBL con DC pulsadas por ARN

En la búsqueda de un enfoque de alto rendimiento, se exploró el potencial de usar múltiples antígenos candidatos en paralelo para la sensibilización de células T CD4⁺. Por tanto, se activaron las células T CD4⁺ presentes en PBL sin separar usando DC transfectadas con especies de ivt-ARN que codifican para cuatro antígenos C/T diferentes (GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 y XAGE-1), que se fusionaron con la señal CrossTag. Se transfectaron las DC con cada ivt-ARN individualmente mediante electroporación, tal como se describe (Javorovic, M.*et al.* (2008) Inhibitory effect of RNA pool complexity on stimulatory capacity of RNA-pulsed dendritic cells. *J Immunother* 31(1): 52-62.). Se midió el estado de maduración de las DC transfectadas mediante los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras mediante citometría de flujo. Las DC mostraron un

fenotipo maduro con alta expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD83, CD86) y HLA de clase II (figura 9a). Para evaluar la eficiencia de transfección, se analizó ADNc de antígeno, derivado de ARNm extraído de las DC transfectadas, mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos adquiridos mostraron un intervalo de aumento en $1,5 \cdot 10^5$ a $2 \cdot 10^7$ veces los números de copia de ARNm de antígeno C/T después de la electroporación (figura 9b).

5 Además, aproximadamente el 68% de las DC expresó proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), tal como se detectó mediante citometría de flujo 12 horas después de la transfección con eGFP-ivt-ARN de control (datos no mostrados).

10 Después de la transfección con ARN y antígeno-CrossTA_g, se agruparon las cuatro poblaciones de DC independientes y se usaron simultáneamente para sensibilizar PBL autólogos sin separar de un donante sano. El posterior procedimiento de expansión incluyó dos rondas de estimulación de las CPA. Se descongelaron alícuotas congeladas de las preparaciones de DC iniciales y se usaron para los cultivos de reestimulación.

Aislamiento de células T CD4⁺ activadas

15 Después de cada intervalo de 14 días de cultivo conjunto de DC, los PBL autólogos sensibilizados presentaban un aumento global de 3-4 veces en los números de células. Se midieron los cambios en las razones de CD4:CD8 en múltiples puntos de tiempo para rastrear la expansión de células T CD4⁺ activadas. Además, se incubaron conjuntamente muestras de PBL con DC cargadas con antígeno en presencia de anticuerpo bloqueante de CD40 y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo usando AcM específicos para CD4, CD137 y CD40L (figura 2a). A lo largo del periodo monitorizado, la razón de CD4:CD8 se invirtió desde 1,7 el día 0 hasta 0,7 el día 27, reflejando una proliferación potenciada de células T CD8⁺ (datos no mostrados). Sin embargo, dentro de la población de células T CD4⁺, el porcentaje de células T positivas para CD40L aumentó desde el 4,6% el día 13 hasta más del 30% el día 27. En cambio, el número de supuestas células T reguladoras (Treg), que se describen como células T CD4⁺ monopositivas para CD137 (Schoenbrunn *et al.*, A converse 4-1BB and CD40 ligand expression pattern delineates activated regulatory T cells (Treg) and conventional T cells enabling direct isolation of alloantigen-reactive natural Foxp3⁺ Treg. J Immunol. 2012;189(12):5985-94.), disminuyó en aproximadamente el 36%.

30 Después del tercer ciclo de estimulación, se enriquecieron células T CD4⁺ positivas para CD40L del cultivo de PBL y se clonaron directamente en placas de 96 pocillos mediante FACS (figura 10). Se expandieron las células T CD4⁺ clonadas. Las células en exceso del procedimiento de clonación se establecieron como líneas de células T CD4⁺ positivas para CD40L (CD40L^{pos}) y negativas para CD40L (CD40L^{neg}) en masa. Su análisis indicó un enriquecimiento exitoso de linfocitos T CD4⁺ específicos de antígeno C/T, dado que las células T CD4⁺ clasificadas como CD40L^{pos} proliferaron en casi cuatro veces durante 14 días tras la reestimulación específica de antígeno C/T y liberaron cantidades significativamente mayores de IFN- γ después del cultivo conjunto con CPA transfectadas con ARN en comparación con las células T CD40L^{neg} (figura 2b, c).

Selección de clones de células T CD4⁺ reactivos al antígeno C/T

40 Se sometieron a prueba clones de células T que se expandieron en cultivos de 96 pocillos para determinar la reactividad al antígeno en ensayos de liberación de IFN- γ comenzando 12 días después de la clonación mediante FACS (figura 3a). Los cultivos conjuntos usando una mezcla de las DC cargadas con ARN y cuatro antígenos-CrossTA_g indicaron que, junto a los clones de células T no reactivos e inespecíficos, estaban presentes múltiples clones de células T reactivos al antígeno. Con pocas excepciones, los clones de células T reactivos al antígeno no mostraron activación de fondo en el cultivo conjunto con DC transfectadas con simulación.

50 Para validar estas observaciones, volvieron a someterse a prueba clones seleccionados un día después usando mLCL transfectadas con ivt-ARN como fuente alternativa de CPA. Los ensayos de liberación de IFN- γ y GM-CSF confirmaron los hallazgos previos con DC (figura 3b). Además, se tiñeron clones de células T seleccionados para determinar la expresión en superficie de CD4 y CD8 y se encontró que todos expresaban el correceptor CD4 (figura 3c).

Caracterización molecular y funcional de clones de células T CD4⁺ específicos de antígeno

55 Para analizar las especificidades de antígeno individual de clones de células T CD4⁺ reactivos al antígeno, posteriormente se cultivaron conjuntamente clones individuales con distintas poblaciones de CPA transfectadas con especies individuales de ARN y antígeno-CrossTA_g. Se midieron las respuestas mediante la secreción de IFN- γ usando un ELISA convencional (figura 4). Se detectaron clones de células T CD4⁺ específicos de antígeno que reconocían cada uno de los cuatro antígenos C/T usados para la sensibilización. Los clones de células T no mostraron activación de fondo por las CPA transfectadas con simulación ni ninguna reactividad cruzada detectable a los otros antígenos a los que se expusieron durante la sensibilización.

65 Usando análisis de repertorios de TCR, se identificaron 4 secuencias de receptor de células T únicas a partir de la multitud de clones aislados. Los ensayos de restricción de CMH mostraron que las diferentes células T

reconocían epítomos presentados por diferentes alotipos de CMH de clase II (datos no mostrados).

Se demostró la importancia de tener el antígeno fusionado con la señal CrossTag por el hecho de que las DC proporcionadas con ivt-ARN sin esta señal no pudieron inducir la secreción de IFN- γ por clones de células T CD4⁺ aislados (figura 5a). La secreción de IFN- γ inducida por la activación sólo se provocó cuando se cultivaron conjuntamente clones de células T CD4⁺ con CPA transfectadas con ARN y antígeno-CrossTag. Una excepción fue el clon de células T que expresa GAGE-1-TCR-2, que también reconoció CPA transfectadas con ARN que carece de las señales de clasificación respectivas, aunque a niveles sustancialmente más bajos.

Para confirmar la especificidad de antígeno de los clones de células T CD4⁺ aislados, se cargaron CPA con proteínas recombinantes. Los clones de células T CD4⁺ mostraron una secreción de IFN- γ positiva para CPA cargadas con proteína que fue comparable a la activación observada en el cultivo conjunto con CPA transfectadas con ARN y antígeno-CrossTag (figura 5b).

Identificación directa de epítomos de CMH de clase II

Para estos 4 clones, se usó un método para el mapeo directo de epítomos de CMH de clase II (DEPI) (Milosevic, S. *et al.* (2006) Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus) para definir los epítomos que reconocen en asociación con moléculas de CMH de clase II. Se validó el reconocimiento de fragmentos de antígeno aislados con constructos CrossTag-ARN solapantes cortos y se usaron estos para consignar adicionalmente las secuencias de epítomo mínimas (figura 6a, b). Por tanto, se encontró que GAGE-1-TCR-1 reconocía el epítomo GAGE-1₇₆₋₉₈ presentado por HLA-DRB5*01:01. De manera interesante, los dos clones de células T CD4⁺ específicos de XAGE-1 reconocieron un epítomo XAGE-1₃₇₋₄₉ idéntico presentado por dos alotipos de CMH de clase II diferentes (HLA-DRB1*13:02 y HLA-DRB5*01:01).

Expresión transgénica de TCR específicos de antígeno C/T

Tras el análisis del repertorio de TCR, volvieron a construirse secuencias de TCR aisladas usando vectores de expresión de TCR. Se transfectaron células T CD4⁺ del clon 3H10 (específico de EBNA-3C y restringido por HLA-DRB1*11:01) con las cadenas α y β de TCR correspondientes de los clones de células T CD4⁺ GAGE-1-TCR-2, XAGE-1-TCR-1 o -TCR-2. Se cultivaron conjuntamente células 3H10 modificadas por ingeniería con TCR con CPA cargadas con antígeno C/T (figura 7). Midiendo la secreción de IFN- γ , se mostró que las especificidades de todos los clones de células T CD4⁺ se transfirieron con éxito a las células 3H10, sin alterar su TCR específico de VEB endógeno. Por tanto, después de la transfección de los TCR, las células 3H10 reconocían CPA transfectadas con ivt-ARN y EBNA-3C-CrossTag, así como CPA transfectadas con el ivt-ARN y antígeno C/T-CrossTag correspondiente.

Métodos

Constructos genéticos

Se usó el vector pGEM-eGFP-A120 como constructo de partida para el CrossTag-vector (S. Milosevic). Esta variante poliA120 del vector pGEM original produce ARN transcrito con mayor estabilidad y condujo a una expresión de proteínas mejorada. El plásmido contenía además un sitio AgeI único en el extremo 5' del ADNc de eGFP, así como un sitio EcoRI único en el extremo 3'. La cola poli-A está seguida por un sitio SpeI que permite la linealización del plásmido para la producción de ivt-ARN.

Se clonó el plásmido pGEM-CrossTag-A120 reemplazando eGFP por ADNc que codifica para la señal de direccionamiento CrossTag. La secuencia de CrossTag consiste en la señal de translocación en el RE de la proteína 1 de membrana asociada a lisosomas humana (LAMP-1, n.º de registro: NP_005552, aa 1-28) fusionada en 5' con el dominio transmembrana y citoplásmico de DC-LAMP (n.º de registro: NP_055213, aa 376-416). Para la inserción de ADNc que codifica para antígeno, las distintas secuencias de CrossTag se separan mediante un espaciador de 18 pb que contiene los sitios de restricción NheI, KpnI y PstI sin alterar el marco de lectura abierto (ORF) de LAMP1. La secuencia de CrossTag con codones optimizados se diseñó prácticamente usando software de clonación computacional y la sintetizó GeneArt (Regensburg). Posteriormente, se cortó la secuencia de CrossTag completa del ADN del plásmido usando los sitios de restricción AgeI (extremo 5') y EcoRI (extremo 3') y se ligó en el MCS del vector pGEM-A120 digerido del mismo modo.

Para la clonación de diversos constructos de antígeno C/T-CrossTag (pGEM-GAGE-1-CrossTag-A120, pGEM-MAGE-A4-CrossTag-A120, pGEM-NY-ESO-1-CrossTag-A120, pGEM-SSX-4-CrossTag-A120, pGEM-XAGE-1-CrossTag-A120), se amplificó ADNc de antígeno a partir de plásmidos mediante PCR (n.ºs de registro: GAGE-1, U19142; MAGE-A4, NM_001011550; NY-ESO1, AJ003149; SSX-4, U90841; XAGE-1, AF251237) usando cebadores directos e inversos específicos del gen y se ligaron mediante los sitios de restricción NheI y PstI/NotI. Los cebadores usados para las reacciones de PCR están todos disponibles bajo petición. Todas las secuencias de antígeno se insertaron en la señal CrossTag de división de pGEM-CrossTag-A120 sin alterar el ORF inicial.

Para la validación de epítomos de células T CD4⁺, se sintetizaron oligonucleótidos complementarios (Metabion) y se aparearon. Se usaron extremos cohesivos, generados tras el apareamiento, para la ligación directa de estas secuencias de antígeno cortas en el vector CrossTAg.

Producción de ivt-ARN

Tras la linealización con SpeI, se usaron pGEM-plásmidos como moldes para la producción de especies individuales de ivt-ARN (ARN transcrito *in vitro*) usando el kit mMESSAGE mMACHINE T7 (Ambion), según las instrucciones del fabricante. Para el control de calidad, se analizó la longitud del producto ivt-ARN mediante electroforesis en gel de agarosa. Se determinaron la concentración y la pureza por medio del espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Cultivo de células

Se generaron y transfectaron 3d-mDC derivadas de monocitos tal como se describe en Bürdek *et al.* (Journal of Translational Medicine 2010, 8:90). La transfección de ARN de mDC y líneas celulares linfoblastoideas (mLCL) transformadas con mini-virus de Epstein-Barr (VEB) se logró mediante electroporación tal como se describe en Bürdek *et al.* (Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. Journal of Translational Medicine 2010, 8:90).

Se hicieron crecer mLCL como cultivos en suspensión en medio LCL tal como se describió previamente (Milosevic, S. *et al.* (2006) Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigen and epitopes of the Epstein-Barr virus). La carga de mLCL con proteínas se logró cultivando 2×10^6 células en placas de 24 pocillos en 2 ml de medio LCL durante 16 h en presencia de 25 µg de proteína humana recombinante GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 o XAGE-1 (enriquecidas mediante 6x-etiqueta cHis después de la expresión en células HEK-293T). Al final del periodo de incubación, se lavaron las células dos veces usando RPMI 1640 y se cultivaron conjuntamente con clones de células T CD4⁺ específicos.

RT-PCR cuantitativa

Se aisló ARN celular de DC transfectadas y sin transfectar y se sintetizó el ADNc correspondiente con cebadores oligo-dT usando el kit de síntesis de ADN de primera cadena para la RT-PCR (AMV) (Roche). Las diferencias en los número de molde del antígeno se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) usando el kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), según el manual del fabricante. Los cebadores específicos del gen (α Enolasa, GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 y XAGE-1) usados para las reacciones de RT-PCR están todos disponibles bajo petición. Las mediciones se normalizaron con respecto al gen constitutivo α Enolasa y se analizaron según el método $\Delta\Delta$ CP.

Fenotipado de superficie de células T y DC

Se detectaron los marcadores de superficie expresados por células T y DC con los siguientes anticuerpos: anticuerpo específico contra CCR7 conjugado con PE (3D12) (eBioscience), anticuerpo específico contra CD4 conjugado con Hz450 (RPA-T4), anticuerpo específico contra CD8 conjugado con Hz500 (RPA-T8), anticuerpo específico contra CD14 conjugado con FITC (M5E2), anticuerpo específico contra CD40 conjugado con PE (5C3), anticuerpo específico contra CD40L conjugado con PE (TRAP1), anticuerpo específico contra CD80 conjugado con PE (L307.4), anticuerpo específico contra CD83 conjugado con FITC (HB15e), anticuerpo específico contra CD86 conjugado con FITC (2331), anticuerpo específico contra CD137 conjugado con CPA (4B4-1), anticuerpo específico contra DC-SIGN conjugado con FITC (DCN46), anticuerpo específico contra HLA-DR conjugado con PE (G46-6) (todos de BD Biosciences). Después del lavado, se tiñeron las células durante 30 min a 4°C y se añadió yoduro de propidio (2 µg/ml) para la exclusión de células muertas. Se analizó la expresión de todos los marcadores de superficie mediante citometría de flujo (LSRII, BD). Se realizó el análisis de datos posterior a la adquisición usando el software FlowJo 8 (TreeStar). El análisis de la expresión en superficie de CD40L en células T se realizó tal como se describe (Frentsch, M. *et al.* (2005) Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. Nat Med 11(10): 1118-1124) usando 2 µg/ml de anticuerpo α CD40 (clon G28.5, proporcionado por M. Frentsch, Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies) y se evaluó 6 h después del inicio del cultivo conjunto de células T:CPA.

Sensibilización *de novo* de PBL con DC transfectadas con ARN

Se transfectaron 3d-mDC de un donante sano en poblaciones independientes con 2 especies individuales de CrossTAg-ARN que codifica para los antígenos C/T GAGE-1, MAGE-A4, SSX-4 y XAGE-1. Después de la electroporación, se recogieron las mDC transfectadas y se cultivaron conjuntamente las mDC mezcladas de esta mezcla a una razón de 1:2 con linfocitos de sangre periférica (PBL), que no fueron adherentes durante la adherencia plástica de PBMC en el procedimiento de generación de mDC. Se cultivaron las células a 37°C en

una atmósfera humidificada. Se añadieron interleucina-2 (IL-2, 20 U/ml; Chiron Behring) y 5 ng/ml de IL-7 (Promokine) después de 1 día y luego cada dos días. Las mDC mezcladas que no se usaron para el cultivo conjunto de PBL se crioconservaron y se descongelaron para la reestimulación del cultivo de PBL inducido *de novo*.

5

Aislamiento y expansión de células T CD4+ específicas de antígeno

Se cultivaron conjuntamente PBL sensibilizadas a una razón de 2:1 con mDC transfectadas con CrossTA_g-ARN (mezcla de 4 antígenos) durante 6 h en presencia de anticuerpo α CD40, tal como se describe (Frentsch, M., (2005) Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. Nat Med 11(10): 1118-1124.). Después del periodo de estimulación, se tiñeron las células con anticuerpos específicos para α CD4 y α CD40L (SK3 y TRAP1; BD Biosciences). Se añadió DAPI para la exclusión de células muertas. Usando un dispositivo FACSaria III (BD Biosciences), se clasificaron las células T CD4+ positivas para CD40L vivas como células individuales en pocillos de placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se expandieron los clones de células T CD4+ en placas de 96 pocillos usando mLCL transfectadas con ivt-ARN y antígeno-CrossTA_g, células alimentadoras e IL-2.

10

15

Ensayo de liberación de citocinas

Para medir la secreción de citocinas inducida por la activación, se cultivaron conjuntamente 5×10^4 células T con 1×10^5 CPA cargadas con ivt-ARN (DC/mLCL) en 200 μ l de medio de células T en placas de 96 pocillos de fondo redondo a 37°C en una atmósfera humidificada. Se usaron células T con CPA transfectadas con simulación o sin células estimuladoras como controles negativos. Después de 16 h de cultivo conjunto, se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando el conjunto de IFN- γ o GM-CSF humanos OptEIA (ambos de BD Biosciences).

20

25

Transferencia de genes de TCR basados en ivt-ARN

Se determinaron las reorganizaciones y las secuencias de la cadena TCR- α y TCR- β mediante PCR usando un panel de cebadores específicos de TCR-V α y TCR-V β tal como se describe (Steinle, A., *et al.* (1995) *In vivo* expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. J Exp Med 181(2): 503-513.). Después de la sustitución de las regiones constantes de ambas cadenas de TCR por sus análogos murinos, se sintetizaron las secuencias con codones optimizados de la cadena TCR- α y TCR- β y se clonaron en un vector de expresión para la producción de ARN. Para validar la especificidad de estas secuencias de TCR, se transfectaron conjuntamente células del clon de células T 3H10 (restringido por HLA-DRB1*11:01, específico de EBNA-3C de VEB) con ivt-ARN de TCR- α y TCR- β y se usaron para los ensayos de secreción de citocinas.

30

35

Lista de secuencias

<110> Medigene Immunotherapies GmbH Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)

45 <120> Generación novedosa de TCR específicos de antígeno

<130> M10977

<150> documento EP15202329

50 <151> 23-12-2015

<150> documento EP16190399

<151> 23-09-2016

55 <160> 54

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

60 <211> 42

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

65 tgtgctgagc ggactcaggg cggatctgaa aagctggtct tt

<210> 2
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 2
 tgtgccaccc agagaaacac tgaagctttc ttt 33

 10 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 3
 Cys Ala Glu Arg Thr Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe
 1 5 10

 <210> 4
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 4
 Cys Ala Thr Gln Arg Asn Thr Glu Ala Phe Phe
 1 5 10
 25
 <210> 5
 <211> 825
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 5
 atgatgaagt gtccacaggc ttactagct atcttttggc ttctactgag ctgggtgagc 60
 agtgaagaca aggtggtaca aagccctcta tctctggttg tccacgaggg agacaccgta 120
 actctcaatt gcagttatga agtgactaac ttctgaagcc tactatggta caagcaggaa 180
 aagaaagctc ccacatttct atttatgcta acttcaagtg gaattgaaaa gaagtcagga 240
 agactaagta gcatattaga taagaaagaa ctttccagca tcctgaacat cacagccacc 300
 cagaccggag actcggccat ctacctctgt gctgagcgga ctcagggcgg atctgaaaag 360
 ctggtctttg gaaagggaaac gaaactgaca gtaaaccat atatccagaa ccctgaccct 420
 gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcaccgat 480
 ttgtattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa 540
 actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac 600
 aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca ttattccaga agacaccttc 660
 ttcccagacc cagaaagttc ctgtgatgtc aagctgggtcg agaaaagctt tgaaacagat 720
 acgaacctaa actttcaaaa cctgtcagtg attgggttcc gaatcctcct cctgaaagtg 780
 gccgggttta atctgctcat gacgctgcgg ctgtggtcca gctga 825

 <210> 6
 <211> 927
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 6
 35

ES 2 863 733 T3

atgggcacaa ggttgttctt ctatgtggcc ctttgtctcc tgtggacagg acacatggat	60
gctggaatca cccagagccc aagacacaag gtcacagaga caggaacacc agtgactctg	120
agatgtcacc agactgagaa ccaccgctat atgtactggg atcgacaaga cccggggcat	180
gggctgaggg tgatccatta ctcatatggt gttaaagata ctgacaaagg agaagtctca	240
gatggctata gtgtctctag atcaaagaca gaggatttcc tcctcactct ggagtccgct	300
accagctccc agacatctgt gtacttctgt gccaccaga gaaacactga agctttcttt	360
ggacaaggca ccagactcac agttgtagag gacctgaaa acgtgttccc acccgaggtc	420
gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc tcccacaccc aaaaggccac actggtgtgc	480
ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag	540
gtgcacagtg gggtcagcac agaccgcag cccctcaagg agcagcccg cctcaatgac	600
tccagatact gcctgagcag ccgcctgagg gtctcggcca ccttctggca gaacccccgc	660
aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac gggctctcgg agaattgacga gtggaccacg	720
gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc agcgccgagg cctggggtag agcagactgt	780
ggcttcacct ccgagtctta ccagcaaggg gtctgtctg ccaccatcct ctatgagatc	840
ttgctaggga aggccacctt gtatgccgtg ctggtcagtg ccctcgtgct gatggccatg	900
gtcaagagaa aggattccag aggctga	927

<210> 7

5 <211> 274

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

ES 2 863 733 T3

Met Met Lys Cys Pro Gln Ala Leu Leu Ala Ile Phe Trp Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Trp Val Ser Ser Glu Asp Lys Val Val Gln Ser Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Val Val His Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Asn Cys Ser Tyr Glu Val
35 40 45

Thr Asn Phe Arg Ser Leu Leu Trp Tyr Lys Gln Glu Lys Lys Ala Pro
50 55 60

Thr Phe Leu Phe Met Leu Thr Ser Ser Gly Ile Glu Lys Lys Ser Gly
65 70 75 80

Arg Leu Ser Ser Ile Leu Asp Lys Lys Glu Leu Ser Ser Ile Leu Asn
85 90 95

Ile Thr Ala Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Leu Cys Ala Glu
100 105 110

Arg Thr Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe Gly Lys Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Thr Val Asn Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
260 265 270

Ser Ser

<210> 8

5 <211> 308

<212> PRT

ES 2 863 733 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Gly Thr Arg Leu Phe Phe Tyr Val Ala Leu Cys Leu Leu Trp Thr
1 5 10 15

Gly His Met Asp Ala Gly Ile Thr Gln Ser Pro Arg His Lys Val Thr
20 25 30

Glu Thr Gly Thr Pro Val Thr Leu Arg Cys His Gln Thr Glu Asn His
35 40 45

Arg Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly His Gly Leu Arg Leu
50 55 60

Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Lys Asp Thr Asp Lys Gly Glu Val Ser
65 70 75 80

Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Ser Lys Thr Glu Asp Phe Leu Leu Thr
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Thr Ser Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Thr
100 105 110

Gln Arg Asn Thr Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val
115 120 125

ES 2 863 733 T3

Val Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu
130 135 140

Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys
145 150 155 160

Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val
165 170 175

Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu
180 185 190

Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
195 200 205

Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
210 215 220

Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln
225 230 235 240

Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly
245 250 255

Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu
260 265 270

Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
275 280 285

Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys
290 295 300

Asp Ser Arg Gly
305

<210> 9

<211> 39

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

tgtgctctgc gtcaaaccctc ctacgacaag gtgatattt

39

<210> 10

<211> 45

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

tgtgccagca gcttagcgga cagggggagt gaaaaactgt tttt

45

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Cys Ala Leu Arg Gln Thr Ser Tyr Asp Lys Val Ile Phe
1 5 10

<210> 12
<211> 15
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12
Cys Ala Ser Ser Leu Ala Asp Arg Gly Ser Glu Lys Leu Phe Phe
1 5 10 15

10 <210> 13
<211> 819
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 13
atgaactatt ctccaggctt agtatctctg atactcttac tgcttgaag aaccctgga 60
aattcagtga cccagatgga agggccagtg actctctcag aagaggcctt cctgactata 120
aactgcacgt acacagccac aggataccct tcccttttct ggtatgtcca ataccctgga 180
gaaggtctac agctcctcct gaaagccacg aaggctgatg acaagggaag caacaaaggt 240
tttgaagcca cataccgtaa agaaaccact tctttccact tggagaaagg ctccagttcaa 300
gtgtcagact cagcgggtgta cttctgtgct ctgcgtcaaa cctcctacga caaggtgata 360
tttgggcccag ggacaagctt atcagtcatt ccaaatatcc agaaccctga ccctgccgtg 420
taccagctga gagactctaa atccagtgac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480
tctcaaaaca atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 540
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtgt tggcctggag caacaaatct 600
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 660
agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tcctcctgaa agtggccggg 780
tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagctga 819

<210> 14
20 <211> 936
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 863 733 T3

```

atgggcacca ggctcctctg ctgggcggcc ctctgtctcc tgggagcaga actcacagaa      60
gctggagttg cccagtctcc cagatataag attatagaga aaaggcagag tgtggctttt      120
tgggtgaatc ctatatctgg ccatgctacc ctttactggg accagcagat cctgggacag      180
ggcccaaagc ttctgattca gtttcagaat aacggtgtag tggatgattc acagttgcct      240
aaggatcgat tttctgcaga gaggtcaaaa ggagtagact ccactctcaa gatccagcct      300
gcaaagcttg aggactcggc cgtgtatctc tgtgccagca gcttagcggg caggggggagt      360
gaaaaactgt tttttggcag tggaaccag ctctctgtct tggaggacct gaacaagggtg      420
ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccctaaaag      480
gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc ttccccgacc acgtggagct gagctggtgg      540
gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agcacggacc cgcagcccct caaggagcag      600
cccgccctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgaggggtctc ggccaccttc      660
tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat      720
gacgagtggg cccaggatag ggccaaaccc gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg      780
ggtagagcag actgtggctt tacctcgggt tcctaccagc aaggggtcct gtctgccacc      840
atcctctatg agatcctgct aggggaaggcc accctgtatg ctgtgctggt cagcgccctt      900
gtgttgatgg ccatgggtcaa gagaaaggat ttctga                                936

```

<210> 15

<211> 272

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```

Met Asn Tyr Ser Pro Gly Leu Val Ser Leu Ile Leu Leu Leu Leu Gly
1          5          10          15

```

```

Arg Thr Arg Gly Asn Ser Val Thr Gln Met Glu Gly Pro Val Thr Leu
          20          25          30

```

```

Ser Glu Glu Ala Phe Leu Thr Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Ala Thr Gly
          35          40          45

```

```

Tyr Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Glu Gly Leu Gln
          50          55          60

```

```

Leu Leu Leu Lys Ala Thr Lys Ala Asp Asp Lys Gly Ser Asn Lys Gly
          65          70          75          80

```

ES 2 863 733 T3

Phe Glu Ala Thr Tyr Arg Lys Glu Thr Thr Ser Phe His Leu Glu Lys
85 90 95

Gly Ser Val Gln Val Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Arg
100 105 110

Gln Thr Ser Tyr Asp Lys Val Ile Phe Gly Pro Gly Thr Ser Leu Ser
115 120 125

Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265 270

<210> 16

<211> 311

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Met Gly Thr Arg Leu Leu Cys Trp Ala Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Glu Leu Thr Glu Ala Gly Val Ala Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ile Ile
20 25 30

ES 2 863 733 T3

Glu Lys Arg Gln Ser Val Ala Phe Trp Cys Asn Pro Ile Ser Gly His
 35 40 45
 Ala Thr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Ile Leu Gly Gln Gly Pro Lys Leu
 50 55 60
 Leu Ile Gln Phe Gln Asn Asn Gly Val Val Asp Asp Ser Gln Leu Pro
 65 70 75 80
 Lys Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Leu Lys Gly Val Asp Ser Thr Leu
 85 90 95
 Lys Ile Gln Pro Ala Lys Leu Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Leu Ala Asp Arg Gly Ser Glu Lys Leu Phe Phe Gly Ser Gly
 115 120 125
 Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu
 130 135 140
 Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys
 145 150 155 160
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu
 165 170 175
 Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr
 180 185 190
 Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr
 195 200 205
 Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro
 210 215 220
 Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn
 225 230 235 240
 Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser
 245 250 255
 Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr
 260 265 270
 Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly
 275 280 285
 Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala
 290 295 300
 Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
 305 310

<210> 17

<211> 42

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 17
tgtgtgtga gagataattc aggaacacac cctcttgtct tt 42

5 <210> 18
<211> 42
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 18
tgtgccagta gtataatcca gggcagtgtc ggctacacct tc 42

<210> 19
<211> 14
15 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19
Cys Ala Val Arg Asp Asn Ser Gly Asn Thr Pro Leu Val Phe
1 5 10

20 <210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 20
Cys Ala Ser Ser Ile Ile Gln Gly Ser Ala Gly Tyr Thr Phe
1 5 10

30 <210> 21
<211> 810
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 21
atgtggggag ttttccttct ttatgtttcc atgaagatgg gaggcactac aggacaaaac 60
attgaccagc ccaactgagat gacagctacg gaaggtgccca ttgtccagat caactgcacg 120
taccagacat ctgggttcaa cgggctgttc tggtagcagc aacatgctgg cgaagcacc 180
35 acattttctgt cttacaatgt tctggatggt ttggaggaga aaggctcgtt ttcttcattc 240
cttagtcggt ctaaagggtta cagttacctc cttttgaagg agctccagat gaaagactct 300
gcctcttacc tctgtgtgtg gagagataat tcaggaaaca cacctcttgt ctttggaag 360
ggcacaagac tttctgtgat tgcaaataac cagaacctg accctgccgt gtaccagctg 420
agagactcta aatccagtga caagtctgtc tgcctattca ccgattttga ttctcaaaca 480
aatgtgtcac aaagtaagga ttctgatgtg tatatcacag acaaaactgt gctagacatg 540
aggtctatgg acttcaagag caacagtgtc gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca 600
tgtgcaaacg cttcaacaa cagcattatt ccagaagaca cttcttccc cagcccagaa 660
agttcctgtg atgtcaagct ggtcgagaaa agctttgaaa cagatacgaa cctaaacttt 720
caaaacctgt cagtgattgg gttccgaatc ctctcctga aagtggccgg gtttaatctg 780
ctcatgacgc tgcggctgtg gtccagctga 810

<210> 22
<211> 930
40 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 863 733 T3

<400> 22
atgagcaacc aggtgctctg ctgtgtggtc ctttgtttcc tgggagcaaa caccgtggat 60
ggtggaatca ctcagtcccc aaagtacctg ttcagaaagg aaggacagaa tgtgaccctg 120
agttgtgaac agaatttgaa ccacgatgcc atgtactggg accgacagga cccagggcaa 180
gggctgagat tgatctacta ctcacagata gtaaatgact ttcagaaagg agatatagct 240
gaagggtaca gcgtctctcg ggagaagaag gaatcctttc ctctcactgt gacatcggcc 300
caaaagaacc cgacagcttt ctatctctgt gccagtagta taatccaggg cagtgtctggc 360
tacaccttcg gttcggggac cagggttaacc gttgtagagg acctgaacaa ggtgttccca 420
cccgaggctg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca aaaggccaca 480
ctggtgtgcc tggccacagg cttcttcccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 540
gggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcacg gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc 600
ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc cgcctgaggg tctcggccac cttctggcag 660
aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag 720
tggaccacag atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga 780
gcagactgtg gctttacctc ggtgtcctac cagcaagggg tcctgtctgc caccatcctc 840
tatgagatcc tgctagggaa ggccaccctg tatgctgtgc tggtcagcgc ccttgtgttg 900
atggccatgg tcaagagaaa ggatttctga 930

5 <210> 23
<211> 269
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 23

ES 2 863 733 T3

```

Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr
1          5          10          15

Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly
          20          25          30

Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly
          35          40          45

Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser
          50          55          60

Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe
65          70          75          80

Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln
          85          90          95

Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Val Arg Asp Asn Ser Gly
          100          105          110

Asn Thr Pro Leu Val Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Ser Val Ile Ala
          115          120          125

Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
          130          135          140

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
145          150          155          160

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
          165          170          175

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
          180          185          190

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
          195          200          205

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
210          215          220

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
225          230          235          240

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
          245          250          255

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
          260          265

```

<210> 24
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

ES 2 863 733 T3

Met	Ser	Asn	Gln	Val	Leu	Cys	Cys	Val	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Gly	Ala	1	5	10	15
Asn	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Tyr	Leu	Phe	Arg	20	25	30	
Lys	Glu	Gly	Gln	Asn	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Gln	Asn	Leu	Asn	His	35	40	45	
Asp	Ala	Met	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Leu	50	55	60	
Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Ile	Val	Asn	Asp	Phe	Gln	Lys	Gly	Asp	Ile	Ala	65	70	75	80
Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Ser	Phe	Pro	Leu	Thr	85	90	95	
Val	Thr	Ser	Ala	Gln	Lys	Asn	Pro	Thr	Ala	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	100	105	110	
Ser	Ile	Ile	Gln	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	115	120	125	
Leu	Thr	Val	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	130	135	140	
Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	145	150	155	160
Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	165	170	175	
Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	180	185	190	

ES 2 863 733 T3

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
195 200 205

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
210 215 220

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
225 230 235 240

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
245 250 255

Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln
260 265 270

Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
275 280 285

Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
290 295 300

Lys Arg Lys Asp Phe
305

<210> 25

<211> 42

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

10 tgtgctgccc tccgtggagg tagcaactat aaactgacat tt

42

<210> 26

<211> 42

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 26

tgccgcagca gcttgccag gggagtcaat gagcagttct tc

42

<210> 27

20 <211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

25 Cys Ala Ala Leu Arg Gly Gly Ser Asn Tyr Lys Leu Thr Phe
1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Cys Ala Ser Ser Leu Ala Arg Gly Val Asn Glu Gln Phe Phe
1 5 10

35 <210> 29

<211> 825

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 863 733 T3

<400> 29
atgctcctgc tgctcgtccc agtgctcgag gtgattttta ccctgggagg aaccagagcc 60
cagtcggtga cccagcttgg cagccacgtc tctgtctctg aaggagccct ggttctgctg 120
aggtgcaact actcatcgtc tgttccacca tatctcttct ggtatgtgca atacccaac 180
caaggactcc agcttctcct gaagtacaca tcagcggcca ccctgggtta aggcatcaac 240
ggttttgagg ctgaatttaa gaagagtga acctccttcc acctgacgaa accctcagcc 300
catatgagcg acgcggtga gtacttctgt gctgccctcc gtggaggtag caactataaa 360
ctgacatttg gaaaaggaac tctcttaacc gtgaatccaa atatccagaa ccctgaccct 420
gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcaccgat 480
tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa 540
actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac 600
aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca ttattccaga agacaccttc 660
ttccccagcc cagaaagtgc ctgtgatgtc aagctgggtc agaaaagctt tgaaacagat 720
acgaacctaa actttcaaaa cctgtcagtg attgggttcc gaatcctcct cctgaaagtg 780
gccgggttta atctgctcat gacgctgcgg ctgtggtcca gctga 825

5 <210> 30
<211> 936
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 30
atgggctcca ggctgctctg ttgggtgctg ctttgtctcc tgggagcagg cccagtaaag 60
gctggagtca ctcaaactcc aagatatctg atcaaacga gaggacagca agtgacactg 120
agctgctccc ctatctctgg gcataggagt gtatcctggg accaacagac cccaggacag 180
ggccttcagt tcctctttga atacttcagt gagacacaga gaaacaaagg aaacttcctt 240
ggtcgattct cagggcgcca gttctctaac tctcgtctg agatgaatgt gagcaccttg 300
gagctggggg actcggccct ttatctttgc gccagcagct tggccagggg agtcaatgag 360
cagttcttct ggccagggac acggctcacc gtgctagagg acctgaaaaa cgtgttccca 420
cccagggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca aaaggccaca 480
ctggtgtgcc tggccacagc cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 540
gggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcaca gacccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc 600
ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc cgcctgaggg tctcggccac cttctggcag 660
aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag 720
tggacccagg atagggccaa acctgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga 780
gcagactgtg gcttcacctc cgagtcttac cagcaagggg tcctgtctgc caccatcctc 840
tatgagatct tgctagggaa ggccaccttg tatgccgtgc tggtcagtgc cctcgtgctg 900
atggccatgg tcaagagaaa ggattccaga ggctga 936

15 <210> 31
<211> 274
<212> PRT

ES 2 863 733 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

```

Met Leu Leu Leu Val Pro Val Leu Glu Val Ile Phe Thr Leu Gly
 1          5          10          15

Gly Thr Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Leu Gly Ser His Val Ser Val
          20          25          30

Ser Glu Gly Ala Leu Val Leu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Val
          35          40          45

Pro Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Asn Gln Gly Leu Gln
 50          55          60

Leu Leu Leu Lys Tyr Thr Ser Ala Ala Thr Leu Val Lys Gly Ile Asn
65          70          75          80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Lys Lys Ser Glu Thr Ser Phe His Leu Thr
          85          90          95

Lys Pro Ser Ala His Met Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Ala
          100          105          110

Leu Arg Gly Gly Ser Asn Tyr Lys Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Leu
          115          120          125

Leu Thr Val Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
          130          135          140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
          145          150          155          160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
          165          170          175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
          180          185          190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
          195          200          205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
          210          215          220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
          225          230          235          240

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
          245          250          255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
          260          265          270

```

5 Ser Ser

ES 2 863 733 T3

<210> 32
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32
 Met Gly Ser Arg Leu Leu Cys Trp Val Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys
 20 25 30
 Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His
 35 40 45
 Arg Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe
 50 55 60
 Leu Phe Glu Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro
 65 70 75 80

ES 2 863 733 T3

Gly Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn
85 90 95

Val Ser Thr Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Ala Arg Gly Val Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg
115 120 125

Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
130 135 140

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
145 150 155 160

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
165 170 175

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
180 185 190

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
195 200 205

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
210 215 220

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
225 230 235 240

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
245 250 255

Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln
260 265 270

Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
275 280 285

Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
290 295 300

Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
305 310

<210> 33

<211> 28

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Met Ala Ala Pro Gly Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala
20 25

<210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 34
 Met Ala Ala Pro Gly Ser Ala Arg Arg Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

 Leu Leu Leu Leu Gly Leu Met His Cys Ala Ser Ala Ala
 20 25

 10 <210> 35
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <400> 35
 Ser Ser Asp Tyr Thr Ile Val Leu Pro Val Ile Gly Ala Ile Val Val
 1 5 10 15

 Gly Leu Cys Leu Met Gly Met Gly Val Tyr Lys Ile Arg Leu Arg Cys
 20 25 30

 Gln Ser Ser Gly Tyr Gln Arg Ile
 35 40

 <210> 36
 <211> 14
 20 <212> PRT
 <213> virus de Epstein-Barr

 <400> 36
 Val Val Arg Met Phe Met Arg Glu Arg Gln Leu Pro Gln Ser
 1 5 10

 25 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 30 <400> 37
 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
 1 5

 <210> 38
 35 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido hidrófobo

 <400> 38
 Tyr Xaa Xaa Xaa
 50 1

<210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 39
 Tyr Gln Arg Ile
 1
 <210> 40
 10 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40
 Met Val Cys Phe Arg Leu Phe Pro Val Pro Gly Ser Gly Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Val Cys Leu Val Leu Gly Ala Val Arg Ser Tyr Ala
 15 20 25
 <210> 41
 <211> 29
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 41
 Met Val Cys Phe Arg Leu Phe Pro Val Pro Gly Ser Gly Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Val Cys Leu Val Leu Gly Ala Val Arg Ser Tyr Ala Leu
 20 25
 25
 <210> 42
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 42
 Met Pro Arg Gln Leu Ser Ala Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Ile Leu His Asp Gly Ser Gln Met Arg Ala
 20 25
 <210> 43
 35 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43
 Met Pro Arg Gln Leu Ser Ala Ala Ala Ala Leu Phe Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Ile Leu His Asp Gly Ser Gln Met Arg Ala Lys
 40 20 25
 <210> 44
 <211> 21
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44

ES 2 863 733 T3

Met Arg Leu Ala Val Leu Phe Ser Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Gly Thr Gly
20

<210> 45
<211> 22
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45
Met Arg Leu Ala Val Leu Phe Ser Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Gly Thr Gly Asn 20
10

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 46
Met Leu Leu Leu Pro Phe Gln Leu Leu Ala Val Leu Phe Pro Gly Gly
1 5 10 15

Asn

20 <210> 47
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 47
Met Leu Leu Leu Pro Phe Gln Leu Leu Ala Val Leu Phe Pro Gly Gly
1 5 10 15

25 Asn Ser

<210> 48
<211> 23
<212> PRT
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 48
Gln Glu Gln Gly His Pro Gln Thr Gly Cys Glu Cys Glu Asp Gly Pro
1 5 10 15

Asp Gly Gln Glu Met Asp Pro
20

35 <210> 49
<211> 40
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 49
Glu Asp Glu Gly Ala Ser Ala Gly Gln Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asp
1 5 10 15

Ser Gln Glu Gln Gly His Pro Gln Thr Gly Cys Glu Cys Glu Asp Gly
20 25 30

ES 2 863 733 T3

Pro Asp Gly Gln Glu Met Asp Pro
35 40

<210> 50
<211> 13
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50
Pro Glu Val Trp Ile Leu Ser Pro Leu Leu Arg His Gly
1 5 10

10 <210> 51
<211> 28
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 51
Pro Ala Thr Arg Val Pro Glu Val Trp Ile Leu Ser Pro Leu Leu Arg
1 5 10 15

His Gly Gly Pro His Thr Gln Thr Gln Asn His Thr
20 25

20 <210> 52
<211> 46
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 52
Gln Glu Gly Glu Asp Glu Gly Ala Ser Ala Gly Gln Gly Pro Lys Pro
1 5 10 15

Glu Ala Asp Ser Gln Glu Gln Gly His Pro Gln Thr Gly Cys Glu Cys
20 25 30

25 Glu Asp Gly Pro Asp Gly Gln Glu Met Asp Pro Pro Asn Pro
35 40 45

<210> 53
<211> 34
<212> PRT
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 53
Ser Cys Glu Pro Ala Thr Arg Val Pro Glu Val Trp Ile Leu Ser Pro
1 5 10 15

Leu Leu Arg His Gly Gly Pro His Thr Gln Thr Gln Asn His Thr Ala
20 25 30

35 Ser Pro

<210> 54
<211> 42
<212> PRT
40 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

ES 2 863 733 T3

Asp Pro Ser Ser Asp Tyr Thr Ile Val Leu Pro Val Ile Gly Ala Ile
1 5 10 15

Val Val Gly Leu Cys Leu Met Gly Met Gly Val Tyr Lys Ile Arg Leu
20 25 30

Arg Cys Gln Ser Ser Gly Tyr Gln Arg Ile
35 40

REIVINDICACIONES

1. Método para generar linfocitos T específicos de antígeno humano, que comprende las siguientes etapas:

A) expresión de al menos una proteína de fusión, que comprende

- al menos un antígeno o un fragmento del mismo,

- una secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) precedente al extremo N-terminal del antígeno, y

- un dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica tras el extremo C-terminal del antígeno,

en células presentadoras de antígeno; y

B) exposición de una población de células que comprende linfocitos T a las células presentadoras de antígeno de la etapa A) *in vitro* para activar linfocitos T específicos de antígeno expresados para el antígeno expresado por la célula presentadora de antígeno;

en el que la proteína de fusión comprende al menos dos antígenos o fragmentos de los mismos diferentes,

en el que el fragmento tiene una longitud de un mínimo de 9 aminoácidos.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende además la etapa C1) enriquecimiento de linfocitos T activados y/o específicos de antígeno, que comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados con una molécula de unión que se une específicamente a una proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados o con moléculas de CMH que presentan un epítipo del antígeno deseado;

(b) aislar linfocitos T a los que se une la molécula de unión o la molécula de CMH que presenta un epítipo del antígeno deseado.

3. Método según la reivindicación 2, en el que la proteína marcadora expresada específicamente por linfocitos T activados se selecciona del grupo que consiste en Ox40, CD137, CD40L, PD-1, receptor de IL-2, interferón- γ , IL-2, GM-CSF y TNF- α .

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además la etapa C2) identificación de linfocitos T específicos de antígeno, que comprende las siguientes etapas:

a) incubación de clones celulares expandidos de la población de células que comprende linfocitos T específicos de antígeno activados

con

(i) células presentadoras de antígeno tal como se define en la etapa A), y

(ii) células presentadoras de antígeno de control o en ausencia de células presentadoras de antígeno;

b) comparación del perfil de activación de la incubación con (i) y (ii) para cada clon celular;

c) identificación de clones celulares específicos de antígeno basándose en la comparación de b);

en el que la activación mediante (i), pero no mediante (ii), indica que el clon celular es específico de antígeno.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia señal de translocación en el RE se deriva de una proteína asociada endosómica/lisosómica, y en el que la proteína asociada endosómica/lisosómica se selecciona del grupo que comprende LAMP1, LAMP2, DC-LAMP, CD68 y CD1b, preferiblemente LAMP1.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica se deriva de LAMP1 o DC-LAMP, preferiblemente DC-LAMP.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia señal de translocación en el RE es humana y en el que el dominio transmembrana y citoplásmico que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica es humano.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células presentadoras de antígeno comprenden diferentes poblaciones de células presentadoras de antígeno, expresando cada población una proteína de fusión de antígeno diferente.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células presentadoras de antígeno son células dendríticas maduras generadas mediante un método que comprende las siguientes etapas:
 - i) suministro de monocitos;
 - ii) incubación de los monocitos de la etapa i) con IL-4 y GM-CSF;
 - iii) incubación de los monocitos de la etapa ii) con IL-4 y GM-CSF en combinación con un cóctel de maduración, en el que el cóctel de maduración comprende opcionalmente una combinación de IL- β , TNF- α , INF- γ , agonista de TLR7/8, PGE2 y agonista de TLR3.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población de células que comprende linfocitos T es una población de linfocitos de sangre periférica sin separar.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población de células que comprende linfocitos T está enriquecida en linfocitos T, preferiblemente linfocitos T CD8+ y/o CD4+.
12. Método para generar un TCR específico de antígeno, que comprende las etapas del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y que comprende además la etapa de aislar un TCR a partir del linfocito específico de antígeno activado.
13. Vector de expresión, que comprende:
 - una secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) humana, y
 - un dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica,
 - una secuencia que codifica para al menos dos antígenos diferentes, o fragmentos de los mismos, que se inserta entre la secuencia señal de translocación en el retículo endoplásmico (RE) humana y el dominio transmembrana y citoplásmico humano que comprende una secuencia de direccionamiento endosómica/lisosómica; en el que cada uno de los fragmentos tiene una longitud de un mínimo de 9 aminoácidos.

Figura 1

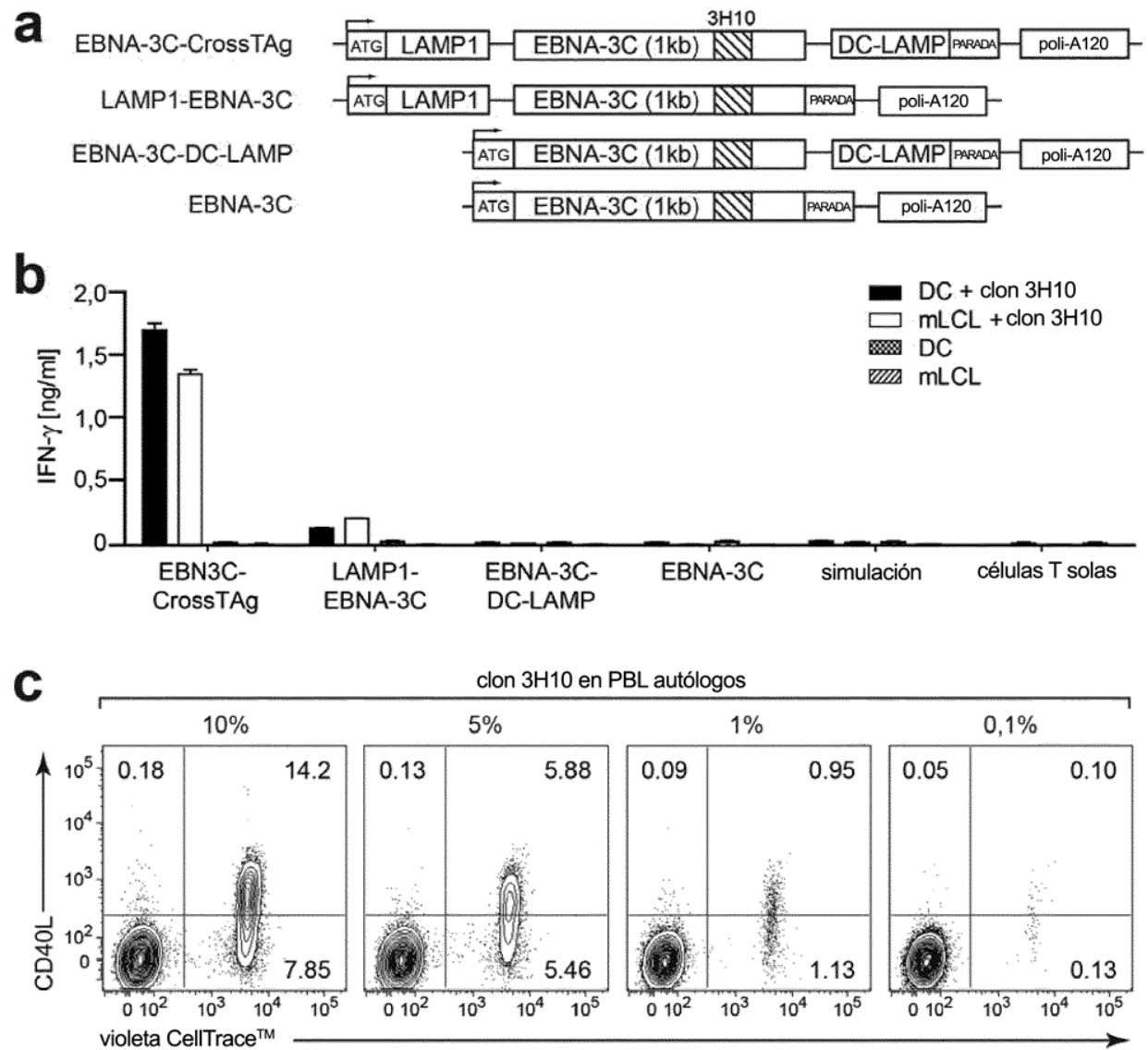


Figura 2

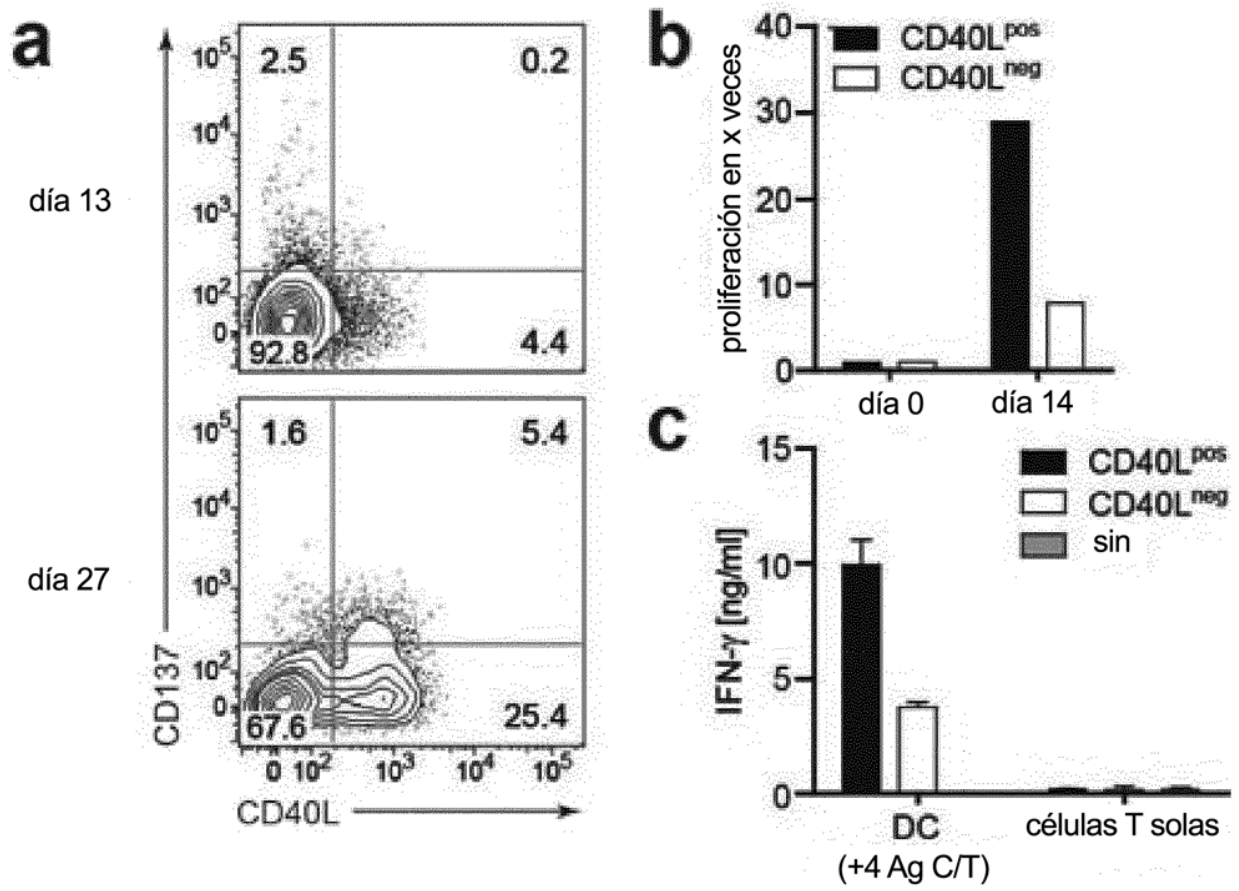


Figura 3

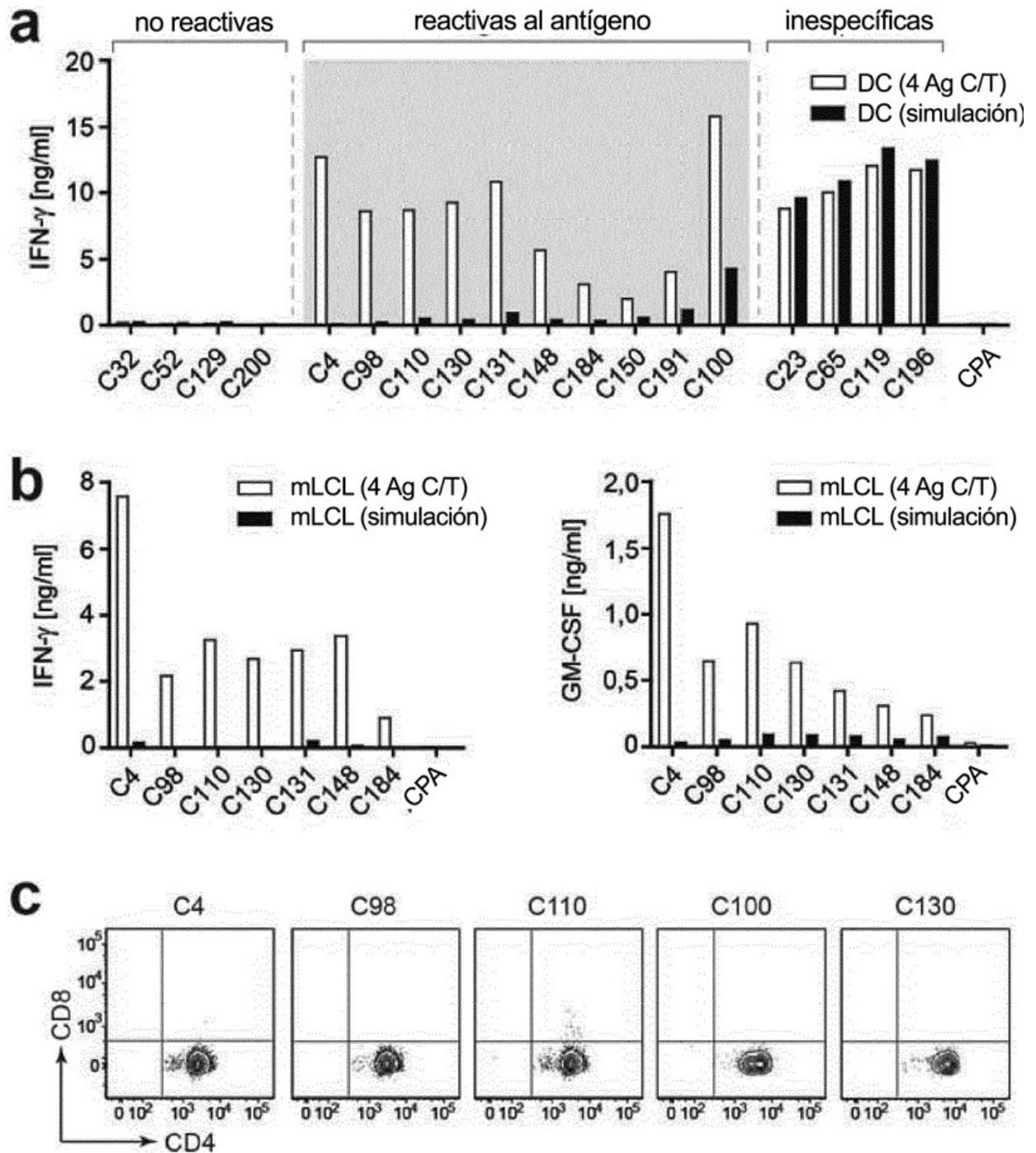


Figura 4

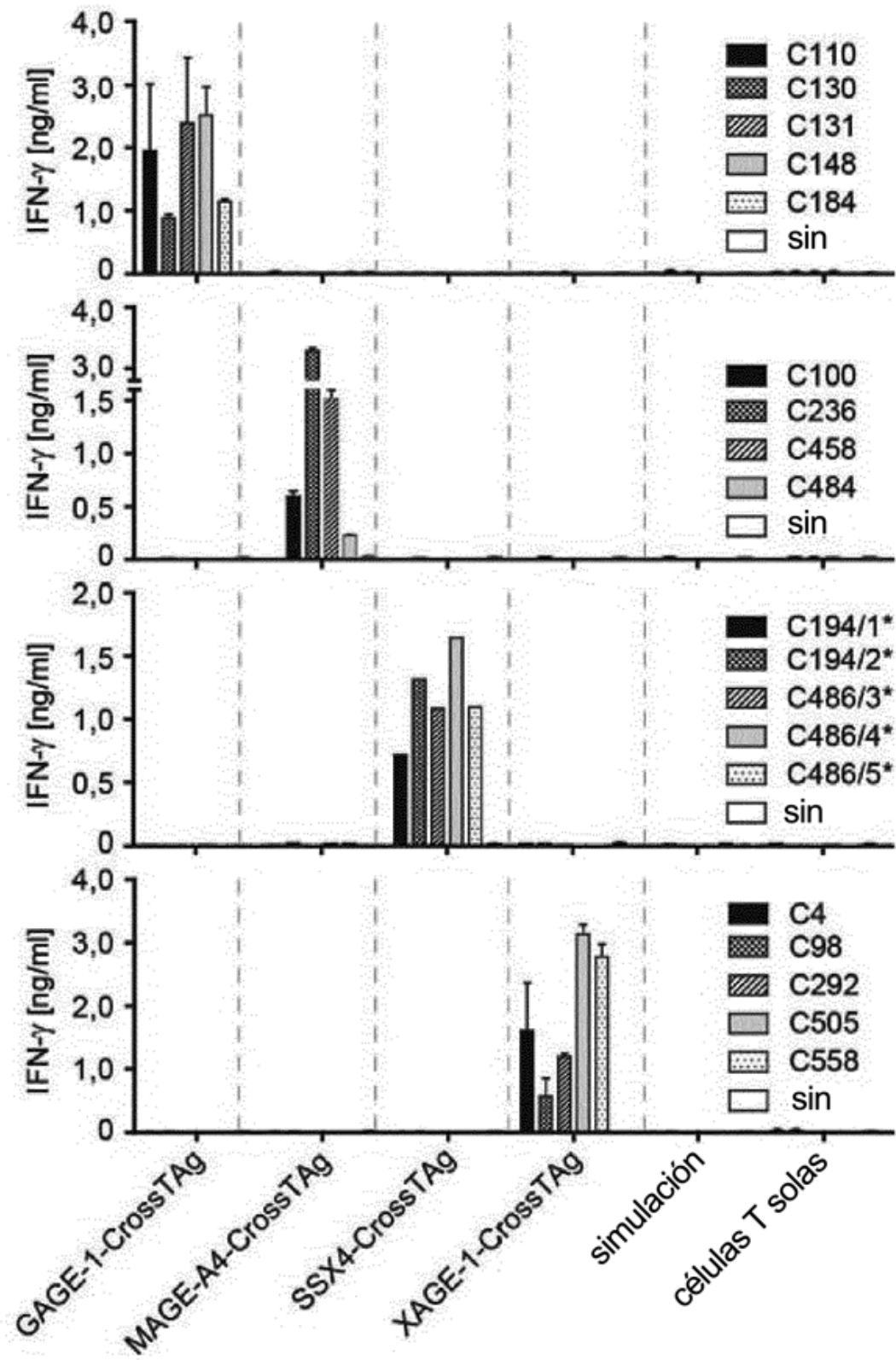


Figura 5

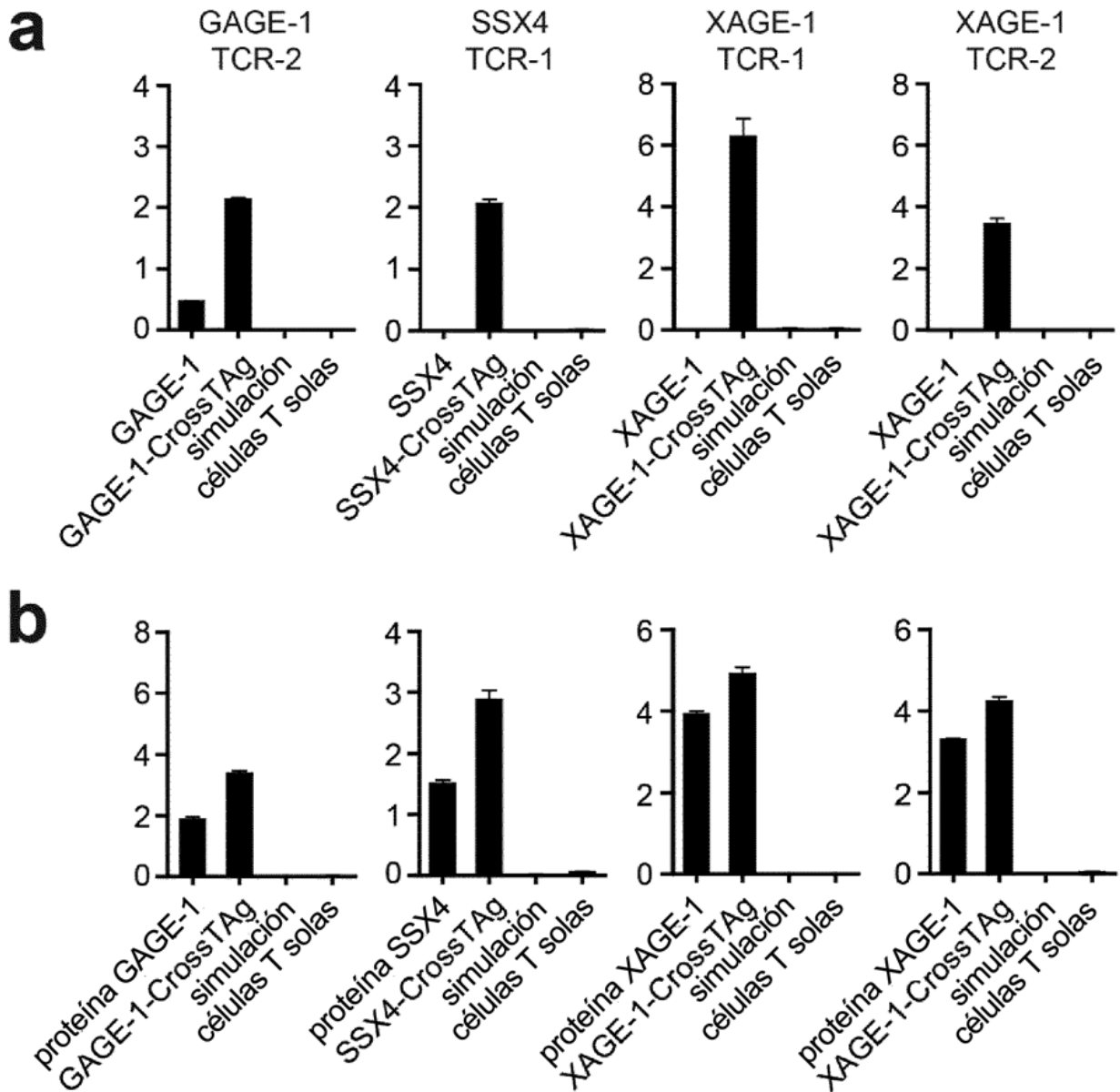


Figura 6

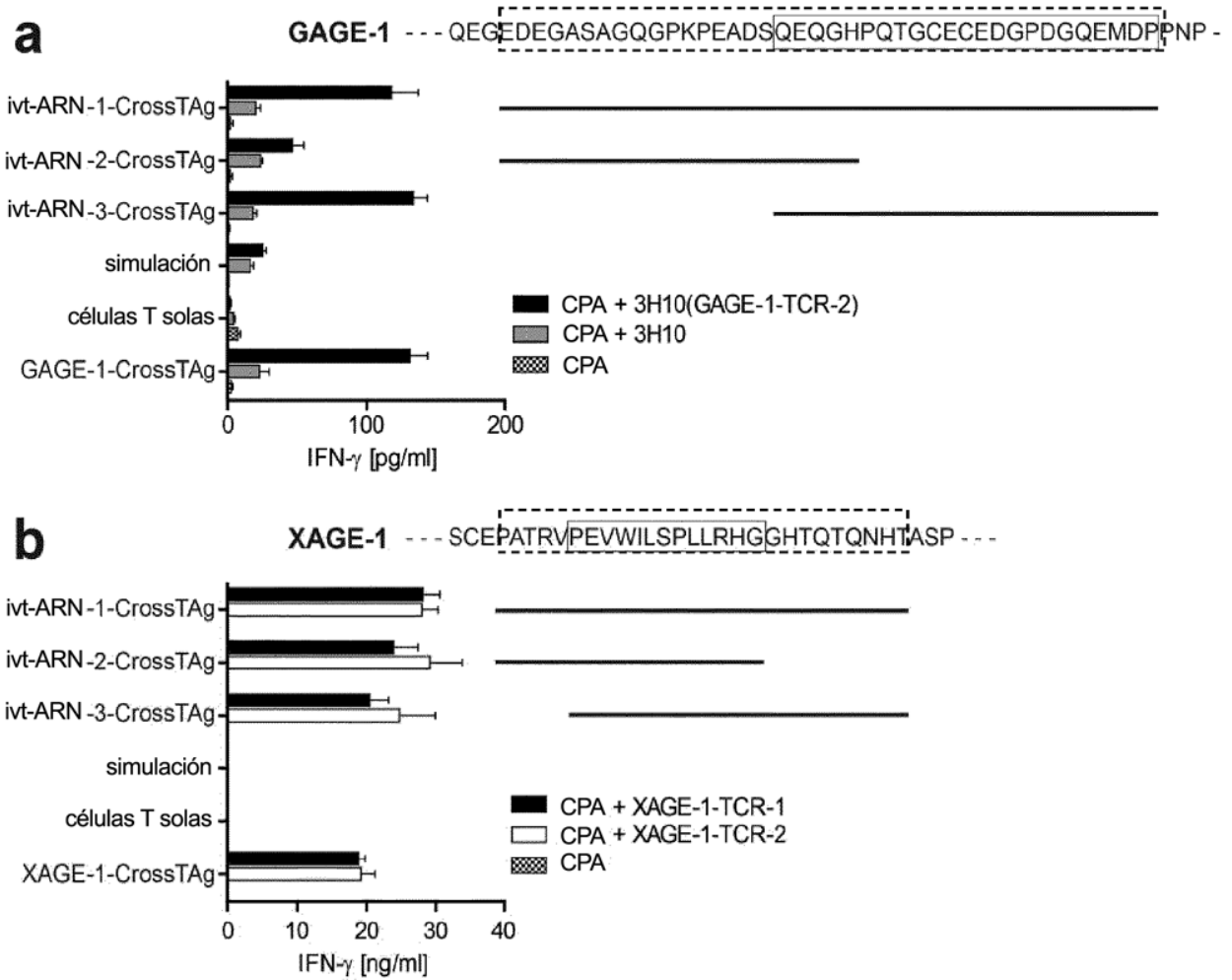


Figura 7

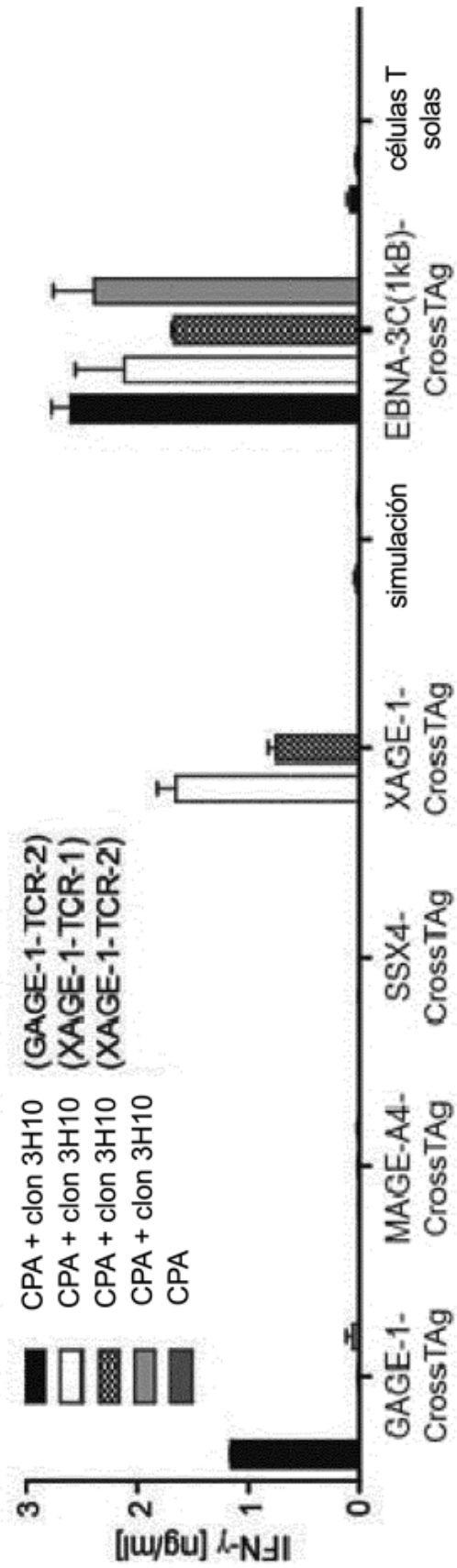


Figura 8

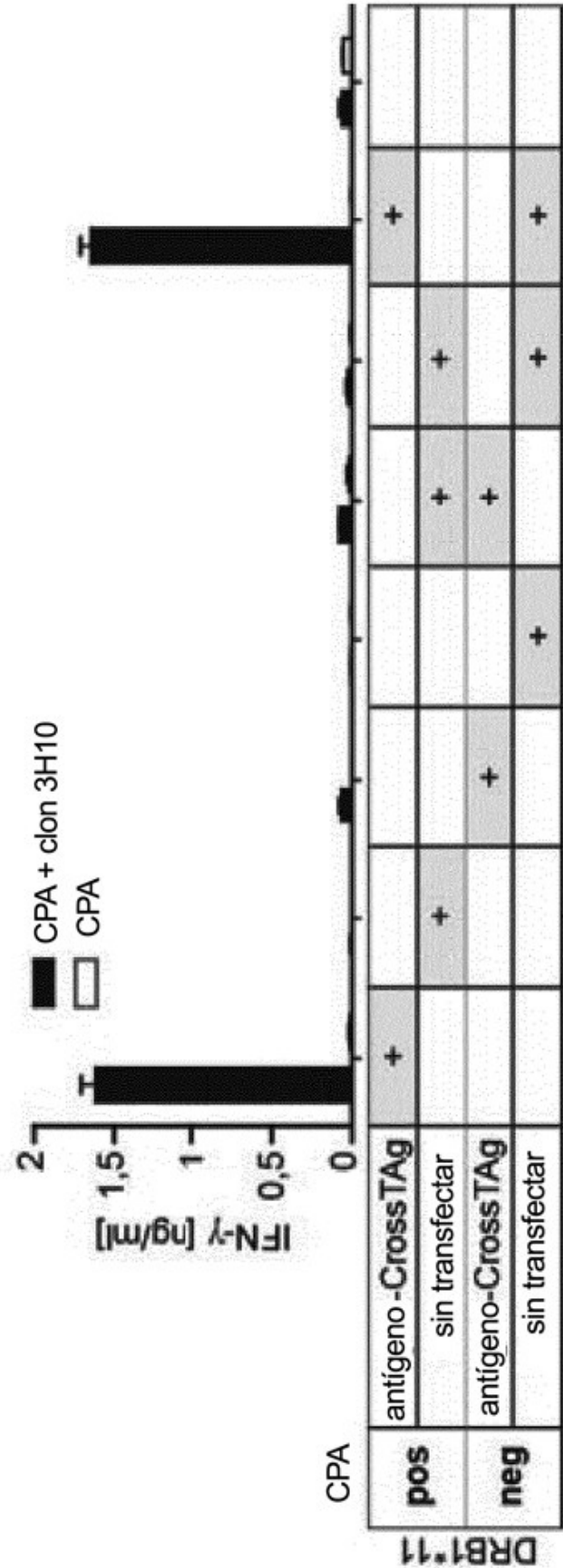


Figura 9

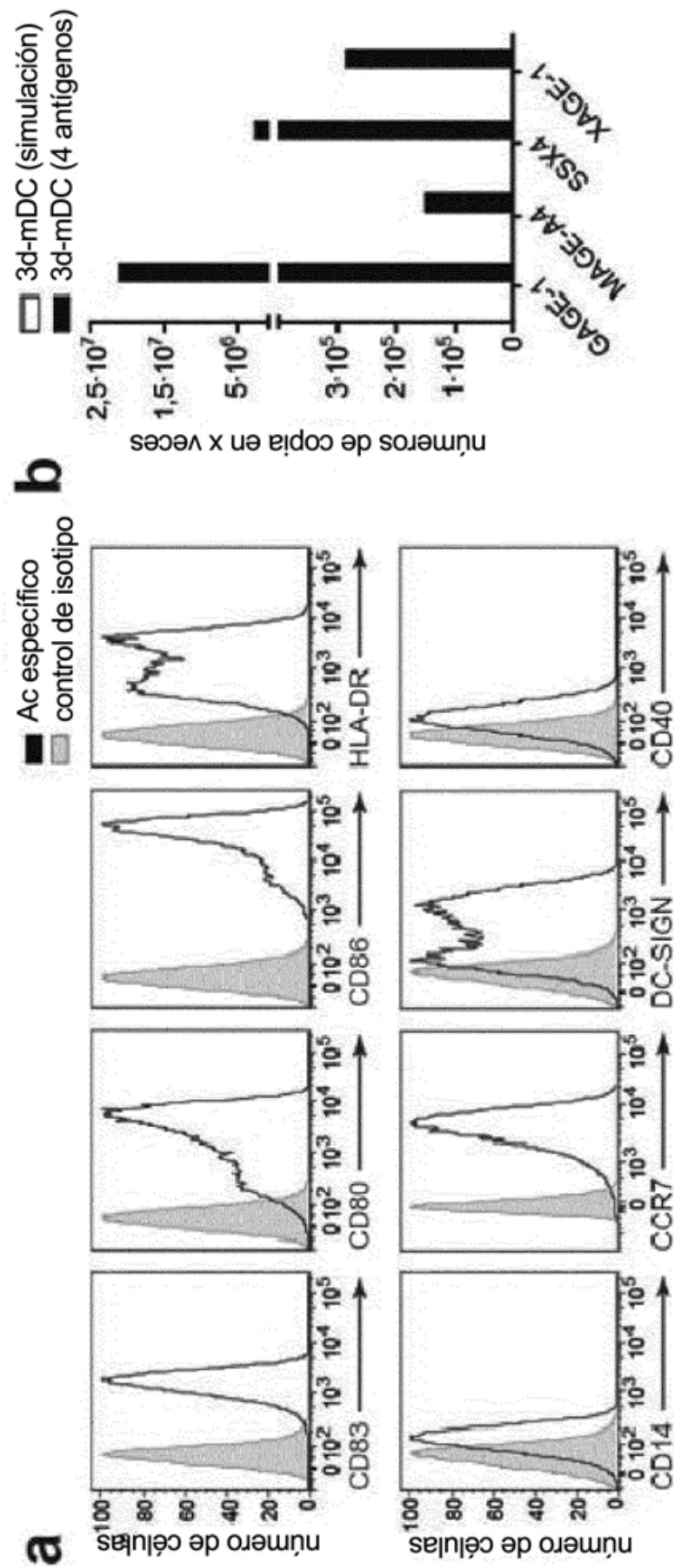


Figura 10

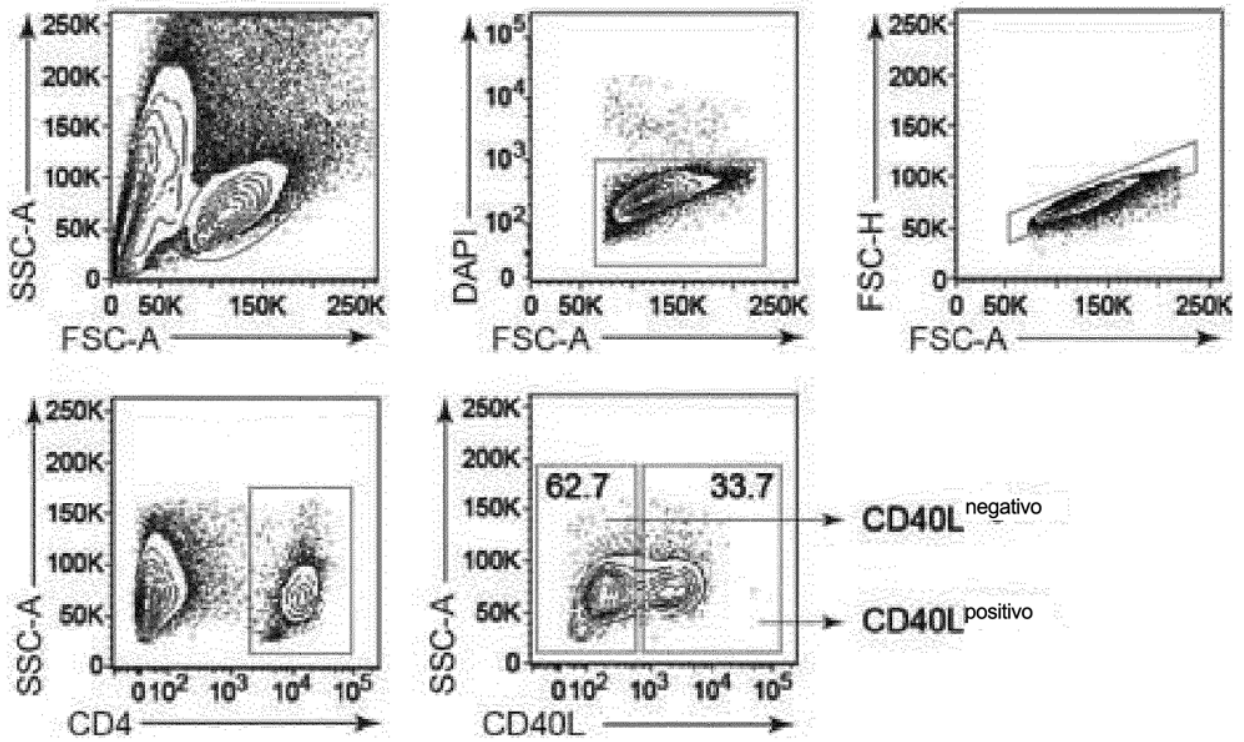
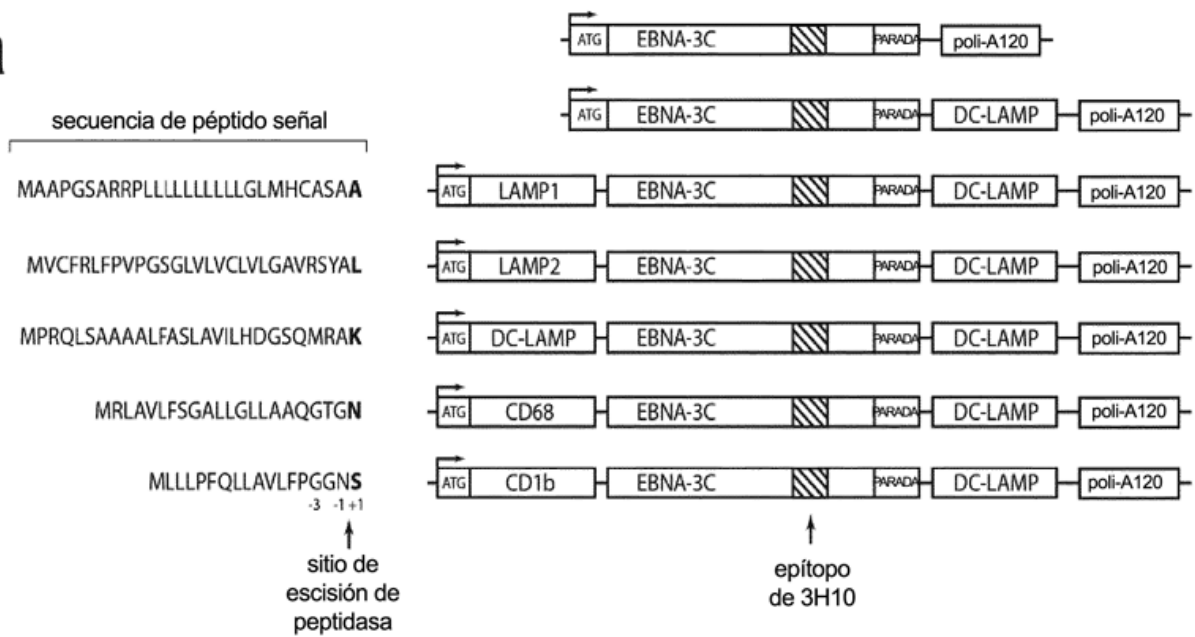


Figura 11

a



b

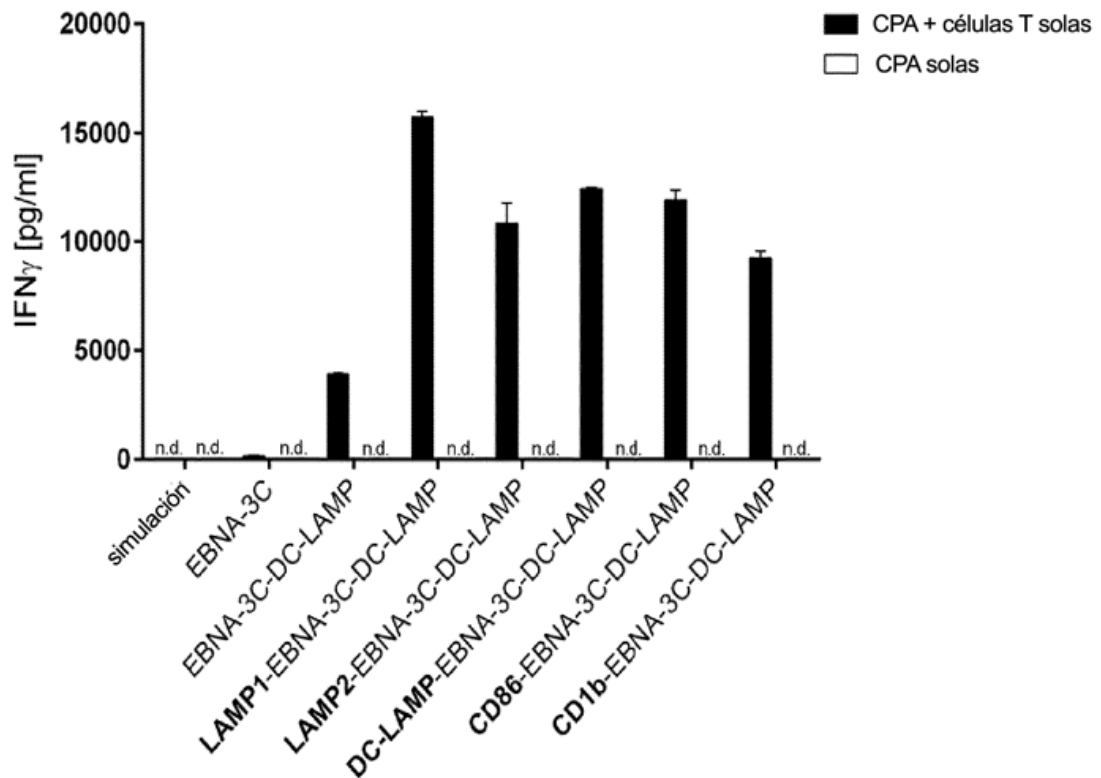


Figura 12

