

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 474**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2013 PCT/US2013/042162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13177247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2013 E 13726389 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2852613**

54 Título: **Receptores murinos de células T anti-NY-ESO-1**

30 Prioridad:

22.05.2012 US 201261650020 P

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

02.07.2019

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES, OFFICE OF TECHNOLOGY
TRANSFER, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH
(100.0%)
6011 Executive Boulevard, Suite 325, MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 718 474 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN**Receptores murinos de células T anti-NY-ESO-1**

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 61/650.020, presentada el 22 de mayo de 2012.

10 Incorporación por referencia de material presentado electrónicamente

Se presenta una lista de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legibles por ordenador junto con el presente documento y se identifica de la siguiente manera: un archivo ASCII (Texto) de 23.462 bytes denominado "713415ST25.TXT", con fecha 30 de abril de 2013.

15

Antecedentes de la invención

La terapia celular adoptiva puede representar un tratamiento eficaz para el cáncer en algunos pacientes. Sin embargo, todavía existen obstáculos para el éxito general de la terapia celular adoptiva. Por ejemplo, solo 50% de las muestras tumorales de melanoma pueden generar células T reactivas al tumor. La generación de células T reactivas al tumor a partir de cánceres distintos del melanoma también puede ser difícil. Además, muchos pacientes pueden no tener un tumor susceptible de resección quirúrgica. Por consiguiente, existe una necesidad de receptores de células T para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer.

25 Robbins *et al.* 2011 describen variantes del receptor de células T anti-NY-ESO-1 1G4 y muestran que la transferencia adoptiva de células T autólogas transducidas con un vector retroviral que codifica un TCR (una variante de 1 G4) contra NY-ESO-1_{aa157-165} media la regresión tumoral en pacientes con melanoma metastásico y sarcoma de células sinoviales.

30 Breve compendio de la invención

La presente invención proporciona las siguientes realizaciones definidas en los apartados 1-14:

35 1. Un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la cadena de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEC ID NO: 8, y que tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1), preferiblemente en donde el TCR:

- 40 (a) tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (SEQ ID NO: 2);
- (b) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10; y/o
- (c) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12.

45 2. Un polipéptido aislado o purificado que comprende una porción funcional del TCR según el apartado 1, en donde la porción funcional se une específicamente a NY-ESO-1 y comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, preferiblemente en donde la porción comprende la secuencia de aminoácidos de:

- 50 (a) SEQ ID NO: 9 o 10, o ambas SEQ ID NO: 9 y 10; o
- (b) SEQ ID NO: 11 o 12, o ambas SEQ ID NO: 11 y 12.

55 3. Una proteína aislada o purificada, que se une específicamente a NY-ESO-1 y comprende todas las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8 de acuerdo con el apartado 2, preferiblemente en donde la proteína comprende:

- 60 (a) una primera cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-5 y una segunda cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-8;
- (b) una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o
- (c) una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

4. Una proteína de fusión que comprende la proteína aislada o purificada de acuerdo con el apartado 3.

5. Un anticuerpo recombinante que comprende la proteína aislada o purificada de acuerdo con el apartado 3

o 4.

6. Un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el TCR de acuerdo con el apartado 1, el polipéptido de acuerdo con el apartado 2, o la proteína de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 3-5, preferiblemente en donde la secuencia de nucleótidos

(a) tiene codones optimizados, y/o

(b) comprende SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, ambos SEQ ID NO: 15 y 16, o ambos SEQ ID NO: 19 y 20.

7. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de acuerdo con el apartado 6.

8. El vector de expresión recombinante de acuerdo con el apartado 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 se encuentra 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, preferiblemente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 17.

9. El vector de expresión recombinante de acuerdo con el apartado 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 se encuentra 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, preferiblemente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 18.

10. Una célula anfitriona aislada que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7-9, preferiblemente en donde la célula es humana.

11. Una población de células que comprende al menos una célula anfitriona de acuerdo con el apartado 10.

12. Una composición farmacéutica que comprende el TCR de acuerdo con el apartado 1, el polipéptido de acuerdo con el apartado 2, la proteína de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 3-5, el ácido nucleico de acuerdo con el apartado 6, el vector de expresión recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7-9, la célula anfitriona de acuerdo con el apartado 10, o la población de células de acuerdo con el apartado 11, y un portador farmacéuticamente aceptable.

13. Un método *in vitro* para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con el TCR de acuerdo con el apartado 1, el polipéptido de acuerdo con el apartado 2, la proteína de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 3-5, el ácido nucleico de acuerdo con el apartado 6, vector de expresión recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7-9, la célula anfitriona de acuerdo con el apartado 10, la población de células de acuerdo con el apartado 11, o la composición farmacéutica de acuerdo con el apartado 12, formando así un complejo, y

(b) detectar el complejo, en donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero,

preferiblemente, en donde el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de ovario o sarcoma de células sinoviales.

14. El TCR de acuerdo con el apartado 1, el polipéptido de acuerdo con el apartado 2, la proteína de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 3-5, el ácido nucleico del apartado 6, el vector de expresión recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 7-9, la célula anfitriona de acuerdo con el apartado 10, la población de células de acuerdo con el apartado 11, o la composición farmacéutica de acuerdo con el apartado 12, para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero, preferiblemente en donde el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de ovario o sarcoma de células sinoviales.

En la presente memoria se describe un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1 y que comprende una región variable murina. La descripción también se refiere a polipéptidos y proteínas relacionados, así como a ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas y poblaciones de células. La invención proporciona adicionalmente anticuerpos, o una porción de unión a antígeno de los mismos, y composiciones farmacéuticas relacionadas con los TCR de la invención.

Adicionalmente se describen en la presente memoria métodos para detectar la presencia de cáncer en un mamífero y métodos para el tratamiento o la prevención del cáncer en un mamífero. El método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende células del cáncer con cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células anfitrionas, o anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos de la invención, descritos en la presente memoria, formando así un complejo, y (ii) detectar el complejo, en donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

El método para el tratamiento o la prevención del cáncer en un mamífero descrito en la presente memoria comprende administrar al mamífero cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas descritos en la presente memoria, o cualquier célula anfitriona o población de células anfitrionas que comprende un vector recombinante que codifica cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B son gráficas que muestran la secreción de interferón (IFN)- γ por células T humanas CD8+ (Fig. 1A) o CD4+ (Fig. 1B) transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (círculos sombreados) o un TCR anti-NY-ESO-1 humano (círculos sin sombrear) después del cultivo simultáneo con células dendríticas pulsadas con diversas concentraciones de NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅.

Las Figuras 2A y 2B son gráficas que muestran la secreción de IFN- γ por células T humanas CD8+ (Fig. 2A) o CD4+ (Fig. 2B) transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (barras sombreadas) o un TCR anti-NY-ESO-1 humano (barras sin sombrear) cultivadas solas (medios) cultivadas simultáneamente con células T2 pulsadas con péptido de control, células T2 pulsadas con péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, o una de varias líneas celulares de tumores 888mel (NY-ESO-1⁺), Sk23mel (NY-ESO-1⁺), COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁺), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺), o COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺).

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria se describe un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1 y que comprende una región variable murina. NY-ESO-1 es un antígeno de cáncer testicular (CTA), que se expresa solo en las células tumorales y en las células germinales que no expresan MHC de los testículos y la placenta. NY-ESO-1 se expresa en una variedad de cánceres humanos que incluyen, pero no se limitan a, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de ovario y sarcoma de células sinoviales. La proteína NY-ESO-1 puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 1.

El TCR puede tener especificidad antigénica para cualquier proteína, polipéptido o péptido NY-ESO-1. El TCR puede tener especificidad antigénica para una proteína NY-ESO-1 que comprende, que consiste en, o consiste esencialmente en, SEQ ID NO: 1.

El TCR puede tener especificidad antigénica para un péptido NY-ESO-1 157-165 que comprende, que consiste en, o consiste esencialmente en, SLLMWITQC (SEQ ID NO: 2).

La expresión "que tiene especificidad antigénica" como se emplea en la presente memoria significa que el TCR se puede unir específicamente y reconocer inmunológicamente a NY-ESO-1, de modo que la unión del TCR a NY-ESO-1 provoque una respuesta inmunitaria.

Los TCR descritos en la presente memoria son capaces de reconocer NY-ESO-1 de una manera dependiente de la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Por "manera dependiente de la clase I del MHC", como se emplea en la presente memoria, significa que el TCR provoca una respuesta inmunitaria al unirse a NY-ESO-1 dentro del contexto de una molécula de la clase I del MHC. La molécula de clase I del MHC puede ser cualquier molécula de clase I del MHC conocida en la técnica, p. ej., moléculas HLA-A.

La molécula de clase I del MHC puede ser una molécula HLA-A2.

Los TCR descritos en la presente memoria pueden comprender una región variable murina. Los TCR pueden comprender adicionalmente una región constante derivada de cualquier especie adecuada tal como, p. ej., humano o ratón. Preferiblemente, los TCR comprenden adicionalmente una región constante murina. En una realización especialmente preferida, los TCR de la invención son TCR murinos que comprenden tanto una región variable murina como una región constante murina.

Como se emplea en la presente memoria, el término "murino", cuando se refiere a un TCR o cualquier componente de un TCR descrito en la presente memoria (p. ej., región determinante de la complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena alfa y/o cadena beta), significa un TCR (o componente del mismo) que se obtiene de un ratón, es decir, un TCR (o componente del mismo) que se originó o fue expresado, de una vez, por una célula T de ratón. Deseablemente, el TCR (o componente del mismo) se expresa sobre la superficie de una célula anfitriona humana.

Los TCR descritos en la presente memoria proporcionan muchas ventajas, incluso cuando se utilizan para la

transferencia de células adoptiva. Por ejemplo, sin estar limitado por una teoría o mecanismo particular, se cree que debido a que NY-ESO-1 es expresada por células de múltiples tipos de cáncer, los TCR de la invención proporcionan ventajosamente la capacidad de destruir células de múltiples tipos de cáncer y, por consiguiente, de tratar o prevenir múltiples tipos de cáncer. Además, sin estar limitado por una teoría o mecanismo particular, se cree que debido a que NY-ESO-1 es un antígeno de cáncer testicular que se expresa solamente en células tumorales y células germinales de los testículos y placenta que no expresan MHC, los TCR descritos en la presente memoria se dirigen ventajosamente a la destrucción de células cancerosas mientras minimizan o eliminan la destrucción de células normales no cancerosas, reduciendo de ese modo, por ejemplo, minimizando o eliminando, la toxicidad. También se cree que los TCR murinos pueden proporcionar una mayor expresión (p. ej., un mayor número de TCR) sobre la superficie de una célula anfitriona humana y/o una mayor funcionalidad (según lo medido, por ejemplo, mediante la liberación de citocinas y la citotoxicidad) en comparación con un TCR humano. Sin estar limitados por una teoría particular del mecanismo, se cree que la mejora de la expresión y/o la funcionalidad es el resultado de una reducción en la mezcla de cadenas de TCR endógenas y exógenas (transducidas) en la célula anfitriona. Por consiguiente, se cree que los TCR murinos pueden reemplazar a los TCR endógenos sobre la superficie de una célula anfitriona humana más eficazmente que un TCR humano exógeno. También se cree que los TCR murinos proporcionan un mejor emparejamiento de cadenas de TCR y/o mejores interacciones con el complejo CD3 de la célula anfitriona humana en comparación con los TCR humanos exógenos expresados por una célula anfitriona humana.

En la presente memoria se describe un TCR que comprende dos polipéptidos (es decir, cadenas polipeptídicas), tales como una cadena α de un TCR, una cadena β de un TCR, una cadena γ de un TCR, una cadena δ de un TCR, o una combinación de las mismas. Los polipéptidos del TCR de la invención pueden comprender cualquier secuencia de aminoácidos, siempre que el TCR tenga especificidad antigénica para NY-ESO-1 y comprenda una región variable murina.

El TCR descrito en la presente memoria puede comprender dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende una región variable que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR2 y una CDR3 de un TCR. Preferiblemente, la primera cadena polipeptídica comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de la cadena α), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (CDR2 de la cadena α) y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (CDR3 de la cadena α), y la segunda cadena polipeptídica comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (CDR1 de la cadena β), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (CDR2 de la cadena β), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (CDR3 de la cadena β). A este respecto, el TCR de la invención puede comprender las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3-5, 6-8 y 3-8. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.

De forma alternativa o adicional, el TCR puede comprender una secuencia de aminoácidos de una región variable de un TCR que comprende las CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α) o 10 (la región variable de una cadena β), o ambos SEQ ID NO: 9 y 10. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10.

De forma alternativa o adicional, el TCR puede comprender una cadena α de un TCR y una cadena β de un TCR. Cada una de la cadena α y la cadena β del TCR de la invención puede comprender independientemente cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, la cadena α comprende la región variable de una cadena α como se expuso anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Un TCR de este tipo se puede emparejar con cualquier cadena β de un TCR. Preferiblemente, la cadena β del TCR comprende la región variable de una cadena β como se expuso anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. El TCR de la invención, por lo tanto, puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o 12, o ambos SEQ ID NO: 11 y 12. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12.

También se describe en la presente memoria un polipéptido aislado o purificado que comprende una porción funcional de cualquiera de los TCR descritos en la presente memoria. El término "polipéptido" como se emplea en la presente memoria incluye oligopéptidos y se refiere a una sola cadena de aminoácidos conectados por uno o más enlaces peptídicos.

Con respecto a los polipéptidos, la porción funcional puede ser cualquier porción que comprenda aminoácidos contiguos del TCR del que forma parte, siempre que la porción funcional se una específicamente a NY-ESO-1. El término "porción funcional" cuando se utiliza en referencia a un TCR se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR descrito en la presente memoria, cuya parte o fragmento conserva la actividad biológica del TCR del cual forma parte (el TCR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR que conservan la capacidad de unirse específicamente a NY-ESO-1, o de detectar, tratar o prevenir el cáncer, en una medida

similar, en la misma medida o en una medida mayor, que el TCR original. En referencia al TCR original, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más del TCR original.

5 La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi de la porción, o en ambos extremos, cuyos aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR original. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren en la función biológica de la porción funcional, p. ej., específicamente la unión a NY-ESO-1, que tiene la capacidad de detectar cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR original.

15 El polipéptido puede comprender una porción funcional de una o ambas de las cadenas α y β de los TCR, tal como una porción funcional que comprende una o más de CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de la cadena α y/o cadena β de un TCR. A este respecto, el polipéptido puede comprender una porción funcional que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de la cadena α), 4 (CDR2 de la cadena α), 5 (CDR3 de la cadena α), 6 (CDR1 de β cadena), 7 (CDR2 de la cadena β), 8 (CDR3 de la cadena β), o una combinación de los mismos. Preferiblemente, el polipéptido comprende una porción funcional que comprende SEQ ID NO: 3-5, 6-8, o la totalidad de SEQ ID NO: 3-8. Más preferiblemente, el polipéptido comprende una porción funcional que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8.

20 De manera alternativa o adicional, el polipéptido puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR de la invención que comprende una combinación de las regiones CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el TCR puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (la región variable de una cadena α) o 10 (la región variable de una cadena β), o ambos SEQ ID NO: 9 y 10. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10.

30 De manera alternativa o adicional, el polipéptido puede comprender la longitud completa de una cadena α o β de uno de los TCR descritos en la presente memoria. A este respecto, el polipéptido de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o 12. Alternativamente, el polipéptido puede comprender ambas cadenas de los TCR descritos en la presente memoria. Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede comprender ambas secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12.

35 La descripción proporciona adicionalmente una proteína aislada o purificada que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por "proteína" se entiende una molécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas.

40 La proteína descrita en la presente memoria puede comprender una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. La proteína descrita en la presente memoria puede comprender, por ejemplo, una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En este caso, la proteína de la invención puede ser un TCR. Alternativamente, si, por ejemplo, la proteína comprende una sola cadena polipeptídica que comprende SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o si la primera y/o segunda cadenas polipeptídicas de la proteína comprenden adicionalmente otras secuencias de aminoácidos, p. ej., una secuencia de aminoácidos que codifica una inmunoglobulina o una porción de la misma, en ese caso la proteína puede ser una proteína de fusión. A este respecto, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria junto con al menos otro polipéptido. El otro polipéptido puede existir como un polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede existir como un polipéptido, que se expresa en marco (en tándem) con uno de los polipéptidos descritos en la presente memoria. El otro polipéptido puede codificar cualquier molécula peptídica o proteica, o una porción de la misma, que incluya, pero no se limite a, una inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula de MHC, una molécula de CD1, p. ej., CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

55 La proteína de fusión puede comprender una o más copias del: polipéptido y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más, copias del polipéptido y/o del otro polipéptido. Los métodos adecuados para elaborar proteínas de fusión son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, métodos recombinantes. Véase, por ejemplo, Choi et al., Mol. Biotechnol. 31: 193-202 (2005).

60 En algunas realizaciones, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención (que incluyen porciones funcionales y variantes funcionales) se pueden expresar como una proteína única que comprende un péptido conector que conecta la cadena α y la cadena β . Se puede utilizar cualquier péptido conector adecuado para conectar la cadena α y la cadena β en los TCR, polipéptidos y proteínas (que incluyen porciones funcionales y variantes funcionales) de la invención. En una realización, el péptido conector es un péptido 2A de picornavirus. A este respecto, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención (que incluyen porciones funcionales y variantes funcionales) pueden

comprender adicionalmente un péptido conector que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 13. El péptido conector puede facilitar ventajosamente la expresión de un TCR, polipéptido y/o proteína recombinantes en una célula anfitriona. Tras la expresión de la construcción que incluye el péptido conector por una célula anfitriona, el péptido conector se puede escindir, dando como resultado cadenas α y β separadas.

La proteína descrita en la presente memoria puede ser un anticuerpo recombinante que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente memoria. Como se emplea la presente memoria, "anticuerpo recombinante" se refiere a una proteína recombinante (p. ej., modificada genéticamente) que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención y una cadena polipeptídica de un anticuerpo, o una porción de la misma. El polipéptido de un anticuerpo, o una porción del mismo, puede ser una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable o constante de una cadena pesada o ligera, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), o un fragmento Fc, Fab o F(ab)₂' de un anticuerpo, etc. La cadena polipeptídica de un anticuerpo, o una porción del mismo, puede existir como un polipéptido separado del anticuerpo recombinante. Alternativamente, la cadena polipeptídica de un anticuerpo, o una porción del mismo, puede existir como un polipéptido, que se expresa en marco (en tándem) con el polipéptido de la invención. El polipéptido de un anticuerpo, o una porción del mismo, puede ser un polipéptido de cualquier anticuerpo o cualquier fragmento de anticuerpo, incluyendo cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente memoria.

En la presente memoria se describen variantes funcionales de los TCR, polipéptidos y proteínas descritos en la presente memoria. El término "variante funcional", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un TCR, polipéptido o proteína que tienen una identidad de secuencia sustancial o significativa o similitud con un TCR, polipéptido o proteína originales, cuya variante funcional conserva la actividad biológica del TCR, polipéptido o proteína de los cuales es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del TCR, polipéptido o proteína descritos en la presente memoria (el TCR, polipéptido o proteína originales) que conservan la capacidad de unirse específicamente a NY-ESO-1 en un grado similar, el mismo grado, o en mayor grado, que el TCR, polipéptido o proteína originales. En referencia al TCR, polipéptido o proteína originales, la variante funcional puede tener una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, idéntica en al menos aproximadamente 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más al TCR, polipéptido o proteína originales.

La variante funcional puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína originales con al menos una sustitución de aminoácido conservativa. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son conocidas en la técnica e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos conservativa puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (p. ej., Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituida por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (p. ej., Ala), Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido alcalino sustituido por otro aminoácido alcalino (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.

De manera alternativa o adicional, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína originales con al menos una sustitución de aminoácido no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservativa no interfiera en o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos no conservativa aumenta la actividad biológica de la variante funcional, de modo que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con el TCR, polipéptido o proteína originales.

El TCR, el polipéptido o la proteína pueden consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en la presente memoria, de modo que otros componentes de la variante funcional, p. ej., otros aminoácidos, no cambien materialmente la actividad biológica de la variante funcional. A este respecto, el TCR, el polipéptido o la proteína pueden, por ejemplo, consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o 12, o ambos SEQ ID NO: 11 y 12. También, por ejemplo, los TCR, los polipéptidos o las proteínas pueden consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o 10, o ambos SEQ ID NO: 9 y 10. Además, los TCR, polipéptidos o proteínas pueden consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), 8 (CDR3 de cadena β), o cualquier combinación de los mismos, p. ej., SEQ ID NO: 3-5, 6-8, o 3-8.

Los TCR, polipéptidos y proteínas (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales) pueden tener cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los TCR, polipéptidos o proteínas (o las porciones funcionales o las variantes funcionales de los mismos) conserven su actividad biológica, p. ej., la capacidad de unirse específicamente a NY-ESO-1, detectar cáncer en un mamífero, o tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, etc. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una longitud de 50 a 5.000 aminoácidos, tal como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000 o más aminoácidos de longitud. En este sentido, los polipéptidos también incluyen oligopéptidos.

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

Los TCR, polipéptidos y proteínas (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales) se pueden glicosilar, amidar, carboxilar, fosforilar, esterificar, N-acilar, ciclar, por ejemplo, a través de un puente disulfuro, o convertir en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizar o polimerizar, o conjugar.

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

El TCR, polipéptido y/o proteína (incluyendo las porciones funcionales y sus variantes funcionales) se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica. Los métodos adecuados de síntesis de polipéptidos y proteínas *de novo* se describe en referencias, tales como Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2005; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; y Patente de Estados Unidos 5.449.752. Asimismo, los polipéptidos y proteínas se pueden producir recombinantemente utilizando los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria utilizando métodos recombinantes convencionales. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. Adicionalmente, algunos de los TCR, polipéptidos y proteínas (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos) se pueden aislar y/o purificar de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, p. ej., un ratón, un ser humano, etc. Los métodos de aislamiento y purificación son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, los TCR, polipéptidos y/o proteínas descritos en la presente memoria (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos) pueden ser sintetizados comercialmente por compañías, tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

Adicionalmente, en la presente memoria se describen productos conjugados, p. ej., productos bioconjugados, que comprenden cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas de la invención (incluyendo cualquiera de las porciones o variantes funcionales de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células anfitrionas o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos. Los productos conjugados, así como los métodos para sintetizar productos conjugados en general, son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) y Kirin y col., *Inorg Chem.* 44 (15): 5405-5415 (2005)).

Adicionalmente, se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria (incluyendo las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos).

"Ácido nucleico", como se emplea en la presente memoria, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, sintetizado u obtenido (p. ej., aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener un enlace internucleótido natural, no natural o alterado, tal como un enlace de fosforamidato o un enlace de fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. Generalmente se prefiere que el ácido nucleico no comprenda ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, como se comenta en la presente memoria, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

Preferiblemente, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria son recombinantes. Como se emplea en la presente memoria, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas

al unir segmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicar en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de los descritos en el apartado (i) anterior. Para los fines de la presente memoria, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

5 Los ácidos nucleicos se pueden construir basándose en la síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., más arriba, y Ausubel et al. más arriba. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de diferentes maneras diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (p. ej., derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida en N⁶, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracilo-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden adquirir de compañías, tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas, o partes funcionales o variantes funcionales de los mismos. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende, consiste en o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 19 (cadena α de tipo salvaje) o SEQ ID NO: 20 (cadena β de tipo salvaje) o en ambos SEQ ID NO: 19 y 20.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos puede tener codones optimizados. Sin estar limitado por una teoría o mecanismo particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización de codones de la secuencia de nucleótidos puede implicar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifica el mismo aminoácido, pero que puede ser traducido por el ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, lo que aumenta la eficiencia de la traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras secundarias del ARNm que podrían interferir en la traducción, aumentando de ese modo la eficacia de traducción. En una realización, la secuencia de nucleótidos con codones optimizados puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 15 (cadena α con codones optimizados), SEQ ID NO: 16 (cadena β con codones optimizados), SEQ ID NO: 21 (región variable de la cadena α con codones optimizados), SEQ ID NO: 22 (región variable de la cadena β con codones optimizados), ambos SEQ ID NO: 15 y 16, ambos SEQ ID NO: 21 y 22, ambos SEQ ID NO: 15 y 20, o ambos SEQ ID NO: 16 y 19.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica los TCR, polipéptidos y proteínas (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos) puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los péptidos conectores descritos en la presente memoria con respecto a otros aspectos de la invención. En una realización, el péptido conector puede ser codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 14.

Adicionalmente, en la presente memoria se describe un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos aproximadamente 70% o más, p. ej., aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

La secuencia de nucleótidos puede comprender alternativamente una secuencia de nucleótidos que está degenerada con respecto a SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, ambos SEQ ID NO: 15 y 16, ambos SEQ ID NO: 19 y 20, ambos SEQ ID NO: 21 y 22, ambos SEQ ID NO: 15 y 20, o ambos SEQ ID NO: 16 y 19. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID NO: 15, 16, 19, 20, 21 o 22, SEQ ID NO: 15 y 16, SEQ ID NO: 19 y 20, SEQ ID NO: 21 y 22, SEQ ID NO: 15 y 20, o SEQ ID NO: 16 y 19, o una secuencia de nucleótidos que está degenerada con respecto a los mismos.

Adicionalmente, se describe en la presente memoria un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria o una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. .

La secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas hibrida preferiblemente en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia de nucleótidos hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria) en una cantidad que es de forma detectable más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o una que contenga solo algunos emparejamientos erróneos dispersos de una secuencia aleatoria que tenía algunas regiones pequeñas (p. ej., 3-10 bases) que coincidían con la secuencia de nucleótidos. Tales pequeñas regiones de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente altas incluirían, por ejemplo, condiciones de baja concentración de sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl aproximadamente 0,02-0,1 M o su equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70°C. Tales condiciones de alta rigurosidad toleran poca o ninguna discrepancia entre la secuencia de nucleótidos y el molde o hebra diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR de la invención. En general, se aprecia que las condiciones pueden ser más estrictas si se agregan cantidades crecientes de formamida.

Los ácidos nucleicos se pueden incorporar a un vector de expresión recombinante. A este respecto, la descripción proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Para los fines de la presente memoria, el término "vector de expresión recombinante" significa una construcción de oligonucleótido o polinucleótido modificada genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula anfitriona, cuando la construcción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para expresar el ARNm, proteína, polipéptido o péptido dentro de la célula. Los vectores de la invención no son naturales en su conjunto. Sin embargo, partes de los vectores pueden ser naturales. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluyendo, pero no limitados a, ADN y ARN, que pueden ser de hebra sencilla o de doble hebra, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales, y pueden contener nucleótidos naturales, no naturales, o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos de origen natural, de origen no natural, o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los nucleótidos o enlaces internucleotídicos de origen no natural o alterados no obstaculizan la transcripción o replicación del vector.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y se puede utilizar para transformar o transfectar cualquier célula anfitriona adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También se pueden utilizar vectores de bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBE4 y λ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión animal incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). Preferiblemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, p. ej., un vector retroviral o un vector lentiviral.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas, por ejemplo, por Sambrook et al. más arriba, y Ausubel et al. más arriba. Las construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, se pueden preparar para que contengan un sistema de replicación funcional en una célula anfitriona procarionta o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivar, por ejemplo, de ColEI, del plásmido de 2 μ , de λ , de SV40, del virus del papiloma bovino y similares.

Deseablemente, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como los codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos para el tipo de célula anfitriona (p. ej., bacteria, hongo, planta o animal) en el que se introducirá el vector, según sea apropiado y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células anfitrionas transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, p. ej., resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un anfitrión auxótrofo para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo unido operablemente a la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR, polipéptido o proteína (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria o que hibrida con la secuencia de nucleótidos codifica el TCR, polipéptido o proteína. La selección de promotores, p. ej., fuerte, débil,

inducible, específico de tejido y específico del desarrollo, está dentro del conocimiento práctico del profesional. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro del conocimiento práctico del profesional. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, p. ej., un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV y un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden diseñar para la expresión transitoria, para la expresión estable o para ambas. Además, se pueden elaborar vectores de expresión recombinantes para la expresión constitutiva o para la expresión inducible. Adicionalmente, se pueden elaborar vectores de expresión recombinantes para que incluyan un gen suicida.

Como se emplea en la presente memoria, el término "gen suicida" se refiere a un gen que hace que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, p. ej., un fármaco, a la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando la célula se pone en contacto o se expone al agente. Los genes suicidas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Center for Cancer Therapeutics en el Instituto de Investigación del Cáncer, Sutton, Surrey, Reino Unido), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de la timidina quinasa (TK) del Virus del Herpes Simple (HSV), la citosina daminasa, la purina nucleósido fosforilasa y la nitrorreductasa.

Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa posicionada en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta. A este respecto, una realización proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una CDR 1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β , y la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α se encuentra en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β . Del mismo modo, la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β puede encontrarse en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α .

El vector de expresión recombinante puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena alfa y una región variable de la cadena beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa se encuentra en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta. Del mismo modo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta puede encontrarse en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa.

Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena alfa y una cadena beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa se encuentra en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta. Del mismo modo, la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta puede encontrarse en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa. El vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa posicionada en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta puede comprender SEQ ID NO: 17.

Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa posicionada en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta. Sin estar limitado por una teoría o mecanismo particular, se cree que un TCR, polipéptido o proteína (o porción o variante funcional del mismo) codificada por un vector de expresión recombinante en el que la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa está posicionada en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una parte de la cadena beta proporciona una funcionalidad y un reconocimiento del antígeno mejorados en comparación con un TCR, polipéptido o proteína (o porción funcional o variante funcional del mismo) codificado por un vector de expresión recombinante en el que la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa está posicionada en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta. A este respecto, una realización proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una CDR 1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β , y la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α se encuentra en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β . Del mismo modo, la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR1 β , CDR2 β y CDR3 β se puede encontrar en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la CDR1 α , CDR2 α y CDR3 α . En otra realización, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena alfa y una región variable de la cadena beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa se encuentra en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta. Del mismo modo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena beta puede encontrarse en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena alfa. En otra realización más

de la invención, el vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena alfa y una cadena beta, y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa se encuentra en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta. Del mismo modo, la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta puede encontrarse en 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa. El vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena alfa posicionada en 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica toda o una porción de la cadena beta puede comprender SEQ ID NO: 18.

El vector de expresión recombinante puede comprender una etiqueta de ADN. La etiqueta de ADN puede distinguir el vector de expresión recombinante de otro vector que codifica la misma secuencia de proteínas. La etiqueta de ADN puede no estar incluida dentro de la secuencia de nucleótidos que codifica el TCR (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales del mismo), el polipéptido o la proteína de la invención y, por lo tanto, puede no afectar a su expresión. Los vectores de expresión recombinantes que incluyen la etiqueta de ADN hacen posible colocar la misma secuencia de nucleótidos en varias poblaciones de células diferentes y, posteriormente, distinguir entre esas poblaciones en función del vector que contienen.

La descripción proporciona adicionalmente una célula anfitriona que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria. Como se emplea en la presente memoria, el término "célula anfitriona" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula anfitriona puede ser una célula eucariótica, p. ej., de planta, animal, hongo o alga, o puede ser una célula procariótica, p. ej., bacteria o protozoo. La célula anfitriona puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, p. ej., un ser humano. La célula anfitriona puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células anfitrionas adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, células DH5 α de *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Para la amplificación o replicación del vector de expresión recombinante, la célula anfitriona es preferiblemente una célula procariótica, p. ej., una célula DH5 α . Para la producción de un TCR, polipéptido o proteína recombinante, la célula anfitriona es preferiblemente una célula de mamífero. Muy preferiblemente, la célula anfitriona es una célula humana. Si bien la célula anfitriona puede ser de cualquier tipo celular, se puede originar a partir de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, la célula anfitriona puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Preferiblemente, la célula anfitriona puede ser una célula T.

Para los fines de la presente memoria, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, p. ej., una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivada, p. ej., Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, entre otras, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden enriquecer o purificar. La célula T puede ser una célula T humana. La célula T puede ser una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede ser de cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, pero no limitada a, células T doblemente positivas CD4⁺/CD8⁺, células T coadyuvantes CD4⁺, p. ej., células Th₁ y Th₂, células T CD8⁺, células T citotóxicas, linfocitos infiltrantes de tumores, células T de memoria, células T no sometidas a tratamiento previo y similares. Preferiblemente, la célula T puede ser una célula T CD8⁺ o una célula T CD4⁺.

En la presente memoria se describe adicionalmente una población de células que comprende al menos una célula anfitriona descrita en la presente memoria. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula anfitriona que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, p. ej., una célula anfitriona (p. ej., una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células anfitrionas (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula anfitriona que comprende un vector de expresión recombinante, de manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización, la población de células es una población clonal que comprende células anfitrionas que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en la presente memoria.

La descripción proporciona adicionalmente un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una porción funcional de cualquiera de los TCR descritos en la presente memoria. Preferiblemente, la porción funcional se une específicamente a NY-ESO-1, p. ej., la porción funcional que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (CDR1 de cadena α), 4 (CDR2 de cadena α), 5 (CDR3 de una cadena α), 6 (CDR1 de cadena β), 7 (CDR2 de cadena β), 8 (CDR3 de cadena β), SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o una combinación de los mismos, p. ej., 3-5, 6 -8, 3-8 o 9-10. Más preferiblemente, la porción funcional

comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8. En una realización preferida, el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo que está formado por las 6 CDR (CDR1-3 de la cadena alfa y CDR1-3 de la cadena beta). El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que sea conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, p. ej., IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo natural, p. ej., un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, p. ej., ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado por ingeniería genética, p. ej., un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Además, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidéz por la porción funcional del TCR de la invención. Deseablemente, el anticuerpo es específico para la porción funcional del TCR de la invención, de modo que haya una reacción cruzada mínima con otros péptidos o proteínas.

Los métodos para someter a ensayo la capacidad de los anticuerpos para unirse a cualquier porción funcional del TCR son conocidos en la técnica e incluyen cualquier ensayo de unión antígeno-anticuerpo, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véase, p. ej., Janeway et al., más abajo).

Los métodos adecuados para elaborar anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos de hibridoma convencionales son descritos, p. ej., por Köhler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y C. A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2001)). Alternativamente, se conocen en la técnica otros métodos, tales como los métodos de hibridoma-EBV (Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74 (2), 361-67 (1984), y Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y los sistemas de expresión de vectores de bacteriófagos (véase, p. ej., Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Adicionalmente, los métodos para producir anticuerpos en animales no humanos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352).

Además, se puede utilizar la presentación en fagos para generar el anticuerpo descrito en la presente memoria. A este respecto, se pueden generar bibliotecas de fagos que codifican los dominios de unión al antígeno (V) de los anticuerpos utilizando técnicas convencionales de biología molecular y de ADN recombinante (véase, p. ej., Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001)). Los fagos que codifican una región variable con la especificidad deseada se seleccionan para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido se introducen en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma utilizada para la producción de hibridomas, de modo que los anticuerpos que tienen las características de los anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véanse, p. ej., Janeway et al. más arriba, Huse et al. más arriba, y Patente de Estados Unidos 6.265.150).

Los anticuerpos pueden ser producidos por ratones transgénicos que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera específicos. Tales métodos son conocidos en la técnica y son descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.545.806 y 5.569.825, y por Janeway et al. más arriba.

Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica y son descritos con detalle, por ejemplo, por Janeway et al. más arriba, las Patentes de Estados Unidos 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la Patente Europea Núm. 0239400 B1, y la Patente del Reino Unido Núm. 2188638. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar utilizando la tecnología de reconstrucción superficial de anticuerpos descrita en la Patente de Estados Unidos 5.639641 y por Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235, 959-973 (1994).

La descripción también proporciona porciones de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria. La porción de unión a antígeno puede ser cualquier porción que tenga al menos un sitio de unión a antígeno, tal como Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

Se puede generar un fragmento de anticuerpo de fragmento de región variable de cadena sencilla (sFv), que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unida a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo a través de un péptido sintético, utilizando técnicas de tecnología de ADN recombinante de rutina (véase, p. ej., Janeway et al., más arriba). De manera similar, se pueden preparar fragmentos de región variable estabilizados con disulfuro (dsFv) mediante tecnología de ADN recombinante (véase, p. ej., Reiter et al., *Protein Engineering*, 7, 697-704 (1994)). Los fragmentos de anticuerpos de la descripción, sin embargo, no están limitados a estos tipos ilustrativos de fragmentos de anticuerpos.

Además, el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, se pueden modificar para que comprendan una marca detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante), y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro).

- 5 Los TCR, los polipéptidos, las proteínas (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células anfitrionas (incluyendo las poblaciones de los mismos) y los anticuerpos (incluyendo las porciones de unión al antígeno de los mismos) se pueden aislar y/o purificar. El término "aislado" como se emplea en la presente memoria significa que se ha separado de su entorno natural. El término "purificado" como se emplea en la presente memoria significa que se ha incrementado su pureza, en donde "pureza" es un término relativo, y no se debe interpretar necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente 50%, puede ser superior a 60%, 70% u 80%, o puede ser de 100%.
- 10 Los TCR, los polipéptidos, las proteínas (incluyendo las porciones y las variantes funcionales de los mismos), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células anfitrionas (incluyendo las poblaciones de las mismas) y los anticuerpos (incluyendo las porciones de unión a antígeno de los mismos), todos los cuales son denominados colectivamente como "materiales de TCR" en lo sucesivo, se pueden formular en una composición, tal como una composición farmacéutica. A este respecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, porciones funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células anfitrionas (incluyendo las poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluyendo sus porciones de unión a antígeno), y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria que contienen cualquiera de los materiales de TCR pueden comprender más de un material de TCR, p. ej., un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más TCR diferentes.
- 15 Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR combinado con otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, p. ej., asparraginas, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.
- 20 Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los utilizados convencionalmente y está limitado solamente por consideraciones físico-físicas, tales como la solubilidad y la falta de reactividad con el compuesto o los compuestos activos, y por la vía de administración. Los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria, por ejemplo, vehículos, coadyuvantes, excipientes y diluyentes, son bien conocidos por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte para el agente o los agentes activos y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.
- 25 La elección del portador se determinará en parte por el material de TCR concreto, así como por el método concreto utilizado para administrar el material de TCR. Por consiguiente, existe una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las siguientes formulaciones para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal e interperitoneal son ilustrativas y no son limitantes en modo alguno. Se puede utilizar más de una ruta para administrar los materiales de TCR, y en ciertos casos, una ruta particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra ruta.
- 30 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El material de TCR se puede administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido estéril o una mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol, tal como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como el 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos o glicéridos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, un agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros coadyuvantes farmacéuticos.
- 35 Los aceites que se pueden utilizar en formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y minerales. Los ácidos grasos adecuados para uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isotárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.
- 40 Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio y trietanolamina, y detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio y haluros de alquil piridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, alquil, aril y olefino sulfonatos, alquil, olefino, éter y monoglicérido sulfatos, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamídicos de ácidos grasos y copolímeros de

polioxietileno polipropileno, (d) detergentes anfóteros, tales como, por ejemplo, alquil- β -aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

5 Las formulaciones parenterales contendrán típicamente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 25% en peso del material de TCR de la invención en solución. Se pueden utilizar conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el lugar de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones variará típicamente entre aproximadamente 5% y 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos y polietilenglicol sorbitán, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en condiciones de secado por congelación (liofilizados), lo que requiere solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

20 También se describen en el presente memoria formulaciones inyectables. Los requisitos para los portadores farmacéuticos eficaces para las composiciones inyectables son bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, p. ej., *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4^a ed., páginas 622-630 (1986)). Preferiblemente, cuando se administran células, p. ej., células dendríticas, las células se administran mediante inyección.

25 Un experto en la técnica apreciará que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, los materiales de TCR descritos en la presente memoria se pueden formular en forma de complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas.

30 La cantidad o dosis del material de TCR administrado debe ser suficiente para efectuar, p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un período de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de TCR debe ser suficiente para unirse a NY-ESO-1, o detectar, tratar o prevenir el cáncer en un período de aproximadamente 2 horas o más, p. ej., de 12 a 24 horas o más, desde el momento de la administración. En ciertas realizaciones, el período de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis se determinará por la eficacia del material de TCR concreto y la afección del animal (p. ej., ser humano), así como el peso corporal del animal (p. ej., ser humano) a tratar.

35 Se conocen en la técnica muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Para los fines de la invención, se podría utilizar un ensayo que comprende comparar en qué medida se lisan las células diana o se secreta IFN- γ por las células T que expresan el TCR, el polipéptido o la proteína tras la administración de una dosis determinada de dichas células T a un mamífero entre un conjunto de mamíferos a los que se les administra una dosis diferente de células T, para determinar la dosis inicial que se administrará a un mamífero. La medida en que se lisan las células diana o se secreta el IFN- γ tras la administración de una cierta dosis se puede analizar mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria como Ejemplo 3.

40 La dosis del material de TCR también estará determinada por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un material de TCR concreto. Típicamente, el médico a cargo decidirá la dosificación del material de TCR con el cual tratar a cada paciente individual, teniendo en cuenta una variedad de factores, tales como la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el sexo, el material de TCR que se va a administrar, la ruta de administración y la gravedad de la afección que se está tratando. A modo de ejemplo y sin pretender limitar la invención, la dosis del material de TCR puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1.000 mg/kg de peso corporal del sujeto que se está tratando/día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal/día.

45 Un experto normal en la técnica apreciará fácilmente que los materiales de TCR se pueden modificar de varias formas, de modo que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales de TCR se incremente a través de la modificación. Por ejemplo, los materiales de TCR se pueden conjugar directa o indirectamente a través de un puente a un grupo diana. La práctica de conjugar compuestos, p. ej., los materiales de TCR, a radicales de direccionamiento es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995) y la Patente de Estados Unidos 5.087.616. El término "radical de direccionamiento", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula o agente que reconozca específicamente y se una a un receptor de la superficie celular, de tal manera que el radical de direccionamiento dirija el suministro de los materiales de TCR a una población de células sobre cuya superficie se expresa el receptor. Los radicales de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas y cualquier otro

ligando natural o no natural, que se unen a receptores de la superficie celular (p. ej., Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR), Receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), CD28, Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), etc.). El término "puente", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier agente o molécula que une los materiales de TCR con el radical de direccionamiento. Un experto en la técnica reconoce qué sitios en los materiales de TCR, que no son necesarios para la función de los materiales de TCR, son sitios ideales para el anclaje de un puente y/o un radical de direccionamiento, siempre que el puente y/o el radical de direccionamiento, una vez anclados a los materiales de TCR de la invención, no interfieran en la función de los materiales de TCR, es decir, la capacidad de unirse a NY-ESO-1, o de detectar, tratar o prevenir el cáncer.

Alternativamente, los materiales de TCR se pueden modificar en una forma de depósito, de modo que la manera en la que los materiales de TCR se liberan en el organismo al que se administran se controla con respecto al tiempo y la ubicación dentro del organismo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4.450.150). Las formas de depósito de los materiales de TCR pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales de TCR y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en donde los materiales de TCR están encapsulados o difundidos por todo el material y/o la degradación del material no poroso. A continuación, el depósito se implanta en la ubicación deseada dentro del organismo y los materiales de TCR se liberan del implante a una velocidad predeterminada.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la invención, los TCR (que incluyen porciones o variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas o poblaciones de células se pueden utilizar en métodos para el tratamiento o la prevención del cáncer. Sin estar limitados por una teoría o mecanismo particular, se cree que los TCR de la invención se unen específicamente a NY-ESO-1, de modo que el TCR (o polipéptido o proteína de la invención relacionado, o porción funcional o variante del mismo) cuando es expresado por una célula es capaz de mediar una respuesta inmunitaria contra la célula que expresa NY-ESO-1. A este respecto, la descripción se refiere a un método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas descritos en la presente memoria, o cualquier célula anfitriona o población de células que comprenden un vector recombinante que codifica cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras derivadas de los mismos, como se emplean en la presente memoria, no implican necesariamente un tratamiento o prevención de 100% completos. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención, de los cuales un experto en la técnica reconoce que tienen un beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, p. ej., el cáncer, que se está tratando o previniendo. Además, para los fines de la presente memoria, "prevención" puede abarcar el retraso del inicio de la enfermedad, o de un síntoma o afección de la misma.

También se proporciona un método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero. El método comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende células del cáncer, cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención, descritos en la presente memoria, formando de este modo un complejo, y detectar el complejo, en donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

Con respecto al método para detectar cáncer en un mamífero, la muestra de células del cáncer puede ser una muestra que comprenda células completas, productos lisados de las mismas, o una fracción de los productos lisados celulares completos, p. ej., una fracción nuclear o citoplásmica, una fracción de proteína completa, o una fracción de ácido nucleico.

A los efectos del método de detección, el contacto puede tener lugar *in vitro* o *en vivo* con respecto al mamífero. Preferiblemente, el contacto es *in vitro*

Además, la detección del complejo puede ocurrir de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria, se pueden marcar con una marca detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro).

Para los fines de los métodos descritos en la presente memoria, en donde se administran células anfitrionas o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas para el mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas con respecto al mamífero.

5 Con respecto a los métodos descritos en la presente memoria, el cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, incluyendo cualquier tipo de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer de los conductos biliares intrahepáticos, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer
10 mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, peritoneo, omentum y cáncer mesentérico, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer renal (p. ej., carcinoma de células renales (CCR)), cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos
15 blandos, cáncer de estómago, sarcoma de células sinoviales, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. Preferiblemente, el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de ovario o sarcoma de células sinoviales.

El mamífero al que se hace referencia en la presente memoria puede ser cualquier mamífero. Como se emplea en la presente memoria, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero no limitados a, mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsters, y mamíferos del orden Lagomorpha, tales como conejos. Se prefiere que los mamíferos sean del orden Carnivora, incluyendo Félidos (gatos) y Cánidos (perros). Es más preferido que los mamíferos sean del orden Artiodactyla, incluyendo Bóvidos (vacas) y Súidos (cerdos) o del orden Perisodactyla, incluyendo Équidos (caballos). Lo más preferido es que los mamíferos sean del orden Primates, Cébidos o Símidos (monos) o del orden Antropoides (humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.
20
25

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no se debe interpretar que limiten de ningún modo su alcance.

Líneas celulares

35 Las líneas de melanoma 1300mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 624.38mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), A375mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 938mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 888mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), SK23mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 1359mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 1359-A2mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), 624mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), y 1390mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), se generaron a partir de lesiones tumorales reseca-
40 das y se cultivaron en medio R10 que consistía en RPMI 1640 con un suplemento de suero bovino fetal al 10%, 2 mmoles/L de L-glutamina, 50 unidades/ml de penicilina y HEPES de 50 µg/ml (Invitrogen) y 25 mmoles/L (GIBCO, Invitrogen). Otras líneas celulares utilizadas incluyeron: la línea celular de cáncer cervical Caski (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), (ATCC CRL-1550), la línea celular de osteosarcoma Saos2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), (ATCC HTB-85), y la línea celular de neuroblastoma SK NAS-A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), (ATCC CRL-2137), la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas H1299A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), la línea celular de carcinoma de mama MDA-MB-435S-A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺), (ATCC® HTB-
45 129), de las cuales las tres fueron transducidas con una construcción retroviral para expresar HLA-A* 0201 (Navuaux et al., J. Virol., 70: 5701-05 (1996), Parkhurst et al., Clin. Cancer Res., 15: 169-180 (2009), Robbins et al., J. Immunol., 180: 6116-31 (2008), Wargo et al., Cancer Immunol. Immunother., 58: 394 (2009)), COS-A2-ESO, que se transdujo con un vector retroviral que expresaba el gen NY-ESO-1, y COS-A2-CEA, que se transdujo con un vector retroviral que expresaba el gen CEA.
50

Ejemplo 1

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

55 Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-A2 con 100 µg de péptido (NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅) y 120 µg de péptido auxiliar (péptido central del virus de la hepatitis B (HBV):128-140) en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (IFA) por vía subcutánea (s.c.) en la base de la cola (50 µg de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ en cada uno de los dos lados de la cola), seguido de un refuerzo una semana más tarde con la misma inmunización.

60 *Día 0:* Una semana después de la segunda inmunización, los esplenocitos se recogieron y estimularon *in vitro* con uno de los siguientes: (i) esplenocitos HLA-A2+ activados por LPS (3.000 rad) ("blato LPS") pulsados con 1 µg/ml de péptido de cebado y 10 µg/ml de β2-microglobulina humana o (ii) células T2 (17.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido.

- 5 *Día 7:* Los cultivos en masa se evaluaron para determinar la reactividad específica a través de la secreción de IFN γ en el cultivo conjunto con una de las líneas celulares tumorales expuestas en la Tabla 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1 (IFN- γ (pg/ml) después de la estimulación en masa 1; "nt" = no sometido a ensayo). Debido a que la liberación de citocinas a veces fue muy alta en respuesta a las células T2 cargadas con el péptido HBV, los valores subrayados para las dianas tumorales indican el doble del valor de fondo obtenido con el medio solo y los tumores negativos, y los valores subrayados para los péptidos indican el doble del fondo obtenido con T2 y el péptido del HBV.

Tabla 1

	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	Blastos LPS + 1 μ g/ml de péptido	T2 + 1 μ g/ml de péptido	T2 + 0,1 μ g/ml de péptido	T2 + 0,01 μ g/ml de péptido
T2 + HBV	+	-	nt	41	266	200	71
T2 + ESO:157	+	+	nt	<u>549</u>	<u>4505</u>	<u>4,464</u>	<u>406</u>
medio	-	-	nt	22	53	69	41
888mel	-	-	0,02	36	133	110	88
Sk23mel	+	-	0,01	24	76	134	17
1359mel	-	+	5,68	55	92	21	26
1359-A2	+	+	nt	22	98	73	48
A375mel	+	+	59,08	41	47	143	49
624mel	+	+	4,14	41	73	200	22
1390mel	+	+	nt	-	-	-	-
1363mel	+	+	nt	-	-	-	-
COS-A2-CEA	+	-	nt	32	94	67	56
COS-A2-ESO	+	+	nt	33	92	65	61
293-A2-gp100	+	-	nt	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	nt	-	-	-	-

- 10 *Día 11:* Los cultivos en masa reactivos con péptido/tumor se clonaron a 10 células/pocillo en las siguientes condiciones (10 placas por condición): (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 μ g/ml péptido: 5×10^4 células/pocillo; (ii) Alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3.000 rad): 5×10^4 células/pocillo; y (iii) IL-2 de 10 CU/ml.
- 15 *Días 25-30:* Los pocillos con crecimiento positivo se seleccionaron y se reestimularon en placas de 48 pocillos en las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 μ g/ml de péptido: 2×10^5 células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3.000 rad): 1×10^6 células/pocillo; y (iii) IL-2 de 10 CU/ml.
- 20 *Días 37-44:* Los clones se evaluaron para determinar la reactividad específica a través de la secreción de IFN γ en el cultivo conjunto con las líneas celulares tumorales expuestas en la Tabla 2. Las células tumorales se trataron con IFN γ (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes de el ensayo.
- 25 Los esplenocitos estimulados con esplenocitos HLA-A2 + activados por LPS (3.000 rad) pulsados con 1 μ g/ml de péptido de cebado y 10 μ g/ml de β 2-microglobulina humana en el día 0 produjeron 8 de 960 pocillos con crecimiento positivo. Los datos para los dos clones más reactivos se muestran en la Tabla 2 (después de 1 estimulación masiva; IFN- γ (pg/ml)).

Tabla 2

	<u>HLA-A2</u>	<u>NY-ESO-1</u>	<u>copias de ARN por GAPDH (x100)</u>	<u>B</u>	<u>H</u>
T2 + HBV	+	-	nt	393	283
T2 + ESO:157	+	+	nt	<u>>14,000</u>	<u>>14,000</u>
medio	-	-	nt	404	292
888mel	-	-	0,02	386	288
Sk23mel	+	-	0,01	-	-
1359mel	-	+	5,68	354	285
1359-A2	+	+	nt	<u>11,781</u>	<u>16,436</u>
A375mel	+	+	59,08	383	<u>1,954</u>
624mel	+	+	4,14	363	<u>14,298</u>
1390mel	+	+	nt	288	<u>17,567</u>
1363mel	+	+	nt	<u>3,582</u>	-
COS-A2-CEA	+	-	nt	348	289
COS-A2-ESO	+	+	nt	<u>>14,000</u>	<u>>14,000</u>
293-A2-gp100	+	-	nt	373	274
293-A2-ESO	+	+	nt	335	<u>8,813</u>

- 5 *Días 46-49:* Los clones de interés se reestimularon en placas de 24 pocillos en las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18,000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido: 5x10⁵ células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3.000 rad): 1x10⁶ células/pocillo; y (iii) IL-2 de 10 CU/ml. Los clones reestimulados se congelaron instantáneamente para la preparación de ARN.

Ejemplo 2

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

Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-A2 y los esplenocitos se recogieron, se estimularon y se evaluaron para determinar la reactividad específica como se describe en el Ejemplo 1.

- 15 *Día 11:* Los cultivos en masa se reestimularon en placas de 24 pocillos en las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido: 4x10⁵ células/pocillo; (ii) alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3.000 rad): 1x10⁶ células/pocillo; y (iii) IL-2 de 10 CU/ml.

- 20 *Día 19:* Los cultivos en masa (después de dos estimulaciones) se evaluaron para determinar la reactividad específica a través de la secreción de IFN-γ después del cultivo conjunto con las líneas celulares tumorales expuestas en la Tabla 3. Las células tumorales se trataron con IFNγ (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 3 (IFN-γ (pg/ml)).

Tabla 3

	<u>Después de 2 estim. en masa</u>						
	<u>HLA-A2</u>	<u>NY-ESO-1</u>	<u>Copias de ARN por GAPDH (x100)</u>	<u>Blastos LPS + 1 µg/ml de péptido</u>	<u>T2 + 1 µg/ml de péptido</u>	<u>T2 + 0.1 µg/ml de péptido</u>	<u>T2 + 0.01 µg/ml de péptido</u>
T2 + HBV	+	-	nt	195	2,860	16,156	1,058
T2 + ESO:157	+	+	nt	<u>79,524</u>	<u>72,730</u>	<u>47,871</u>	<u>1,899</u>
medio	-	-	nt	137	131	156	406
888mel	-	-	0,02	40	201	112	562
Sk23mel	+	-	0,01	79	245	562	424
1359mel	-	+	5,68	73	169	188	357

ES 2 718 474 T3

	Después de 2 estim. en masa						
	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	Blastos LPS + 1 µg/ml de péptido	T2 + 1 µg/ml de péptido	T2 + 0,1 µg/ml de péptido	T2 + 0,01 µg/ml de péptido
1359-A2	+	+	nt	966	320	1,597	258
A375mel	+	+	59,08	150	176	258	332
624mel	+	+	4,14	320	144	697	301
1390mel	+	+	nt	-	-	-	-
1363mel	+	+	nt	-	-	-	-
COS-A2-CEA	+	-	nt	226	369	400	308
COS-A2-ESO	+	+	nt	424	351	326	295
293-A2-gp100	+	-	nt	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	nt	-	-	-	-

Día 21: Los cultivos en masa se reestimularon en placas de 24 pocillos en las siguientes condiciones: (i) células T2 irradiadas (18.000 rad) pulsadas con 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de péptido: 5x10⁵ células/pocillo; (ii) Alimentadores de esplenocitos C57BL/6 irradiados (3.000 rad): 1x10⁶ células/pocillo; y (iii) IL-2 de 10 CU/ml.

5
Día 30: Los cultivos en masa (después de tres estimulaciones) se evaluaron para determinar la reactividad específica a través de la secreción de IFN-γ después del cultivo conjunto con las líneas celulares tumorales expuestas en la Tabla 4. Las células tumorales se trataron con IFNγ (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 4 (IFN-γ (pg/ml); *indica los cultivos en masa que se clonaron después de tres estimulaciones en masa).

Tabla 4

	HLA-A2	NY-ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	* Blastos LPS + 1 µg/ml de péptido	* T2 + 1 µg/ml de péptido	T2 + 0,1 µg/ml de péptido	T2 + 0,01 µg/ml de péptido	TE8 (clon de células T humanas)
T2 + HBV	+	-	nt	1,794	4,700	28,797	23,897	16
T2 + ESO:157	+	+	nt	<u>78.316</u>	<u>63.793</u>	<u>96.164</u>	19,698	<u>16.254</u>
medio	-	-	nt	1,992	389	8,856	10,711	7
888mel	-	-	0,02	1,268	188	6,611	7,614	13
Sk23mel	+	-	0,01	662	202	7,585	6,225	69
1359mel	-	+	5,68	623	64	5,684	7,026	996
1359-A2	+	+	nt	<u>27.572</u>	<u>7.774</u>	10,324	7,204	<u>7.936</u>
A375mel	+	+	59,08	1,263	342	7,232	9,425	<u>4.095</u>
624mel	+	+	4,14	<u>14.098</u>	<u>3.211</u>	10,061	8,727	<u>3.262</u>
1390mel	+	+	nt	852	179	5,966	6,191	<u>7.123</u>
1363mel	+	+	nt	<u>42.970</u>	<u>15.673</u>	<u>20.398</u>	9,958	<u>12.149</u>
COS-A2-CEA	+	-	nt	981	119	3,995	6,744	18
COS-A2-ESO	+	+	nt	<u>19.523</u>	<u>3.334</u>	9,116	8,187	<u>14.662</u>
293-A2-gp100	+	-	nt	-	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	nt	-	-	-	-	-

Día 33: Los cultivos en masa reactivos con péptidos/tumores seleccionados (después de tres estimulaciones) se clonaron a 10 células/pocillo como se describe para el Día 11 del Ejemplo 1.

5 *Días 45-48:* Los pocillos con crecimiento positivo se examinaron para determinar la reactividad del péptido a través de la secreción de IFN- γ en el cultivo conjunto con las líneas celulares tumorales expuestas en la Tabla 5. Las células tumorales se trataron con IFN γ (20 ng/ml) y factor de necrosis tumoral alfa (3 ng/ml) durante la noche antes del ensayo.

10 Los esplenocitos estimulados con esplenocitos HLA-A2+ activados por LPS (3.000 rad) pulsados con 1 μ g/ml de péptido de cebado y 10 μ g/ml de β 2-microglobulina humana el día 0 produjeron 33 de 960 pocillos de crecimiento positivo. Los datos para los cuatro clones más reactivos (números 2, 5, 6 y 8) se muestran en la Tabla 5 (después de 3 estimulaciones en masa; IFN- γ (pg/ml)). Los esplenocitos estimulados con células T2 (17.000 rad) pulsados con 1 μ g/ml de péptido produjeron 104 de 960 pocillos de crecimiento positivo. Los datos de los cuatro clones más reactivos (números 1, 50, 51 y 63) se muestran en la Tabla 5.

15

TABLA 5

	HILA- A2	NY- ESO-1	Copias de ARN por GAPDH (x100)	2	5	6	8	1	50	51	63
T2+HBV	+	-	nt	235	317	223	344	306	335	270	239
T2+ESO:157	+	+	nt	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000	>14.000
medio	-	-	nt	221	314	231	563	266	232	258	222
888mel	-	-	0.02	210	316	208	288	234	241	244	208
Sk23mel	+	-	0.01	216	308	210	297	278	208	222	207
1359mel	-	+	5.68	243	383	206	422	347	271	212	229
1359-A2	+	+	nt	1.981	6.027	2.523	1.845	1.477	3.661	1.965	2.272
A375mel	+	+	59.08	523	388	232	1.455	556	557	556	737
624mel	+	+	4.14	7.879	1.931	2.527	8.595	4.629	4.487	2.978	7.139
1390mel	+	+	nt	1.124	17.567	362	900	517	379	914	716
1363mel	+	+	nt	-	-	-	-	-	-	-	-
COS-A2-CEA	+	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-
COS-A2-ESO	+	+	nt	-	-	-	-	-	-	-	-
293-A2-gp100	+	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-
293-A2-ESO	+	+	nt	-	-	-	-	-	-	-	-

Días 46-49: Los clones reactivos de péptidos se reestimularon en placas de 24 pocillos como se describe para el Día 21 de este ejemplo. Los clones reestimulados se congelaron instantáneamente para la preparación de ARN.

Ejemplo 3

5 Este ejemplo demuestra el aislamiento de un TCR anti-NY-ESO-1 murino y la reactividad específica del TCR aislado contra NY-ESO-1.

10 Se aislaron los TCR de cinco clones (a saber, los clones B, H, 5, 6, 1, 50 y 63). La secuencia de nucleótidos (ARN) que codifica el TCR de cada clon se aisló, secuenció y transfectó a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas de los pacientes 1 y 2. Las células transfectadas se estimularon con OKT3 e IL-2 y se cultivaron solas (medio) o cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control (HBV), células T2 pulsadas con péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ , COA-A2-CEA (NY-ESO-1), COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺), o una de varias líneas celulares de tumor de melanoma 888mel (NY-ESO-1⁻), Sk23mel (NY-ESO-1⁻), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺), 1390 (NY-ESO-1⁺), o 624 (NY-ESO-1⁺). Se midió la secreción de IFN γ . Los resultados se muestran en la Tabla 6 (IFN γ (pg/ml)).

15

TABLA 6

	T2+HBV	T2+ESO: 157	medio	888	S123	1363	1390	A375	624	COS- A2-CEA	COS-A2- ESO
HLA-A2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
NY-ESO-1	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Paciente 1											
GFP	326	180	8	198	134	220	325	632	32	94	74
TCR Avidex	235	>10,000	7	188	81	>10,000	1637	5752	531	52	2320
TRAV7D-4/TRBV19 ¹	664	>10,000	7	185	102	2262	489	893	39	72	449
TRAV13D-2/TRBV14 ²	197	>10,000	8	152	88	134	159	338	26	75	55
TRAV7D-3/TRBV14 ³	155	366	7	129	112	122	171	378	28	68	71
TRAV6D/TRBV26 ⁴	198	>10,000	11	255	156	>10,000	3859	9973	782	91	3872
TRAV7D-3/TRBV26 ⁵	190	1269	0	208	107	246	189	509	34	79	104
Paciente 2											
GFP	26	30	2	47	27	22	62	98	8	16	19
TCR Avidex	50	>10,000	4	32	22	2484	208	192	150	11	588
TRAV7D-4/TRBV19 ¹	183	>10,000	2	34	15	149	47	39	7	13	90
TRAV13D-2/TRBV14 ²	22	7898	9	27	13	20	42	58	11	22	17
TRAV7D-3/TRBV14 ³	24	23	11	28	13	21	30	39	5	7	13
TRAV6D/TRBV26 ⁴	63	>10,000	39	77	40	3597	777	344	133	32	683
TRAV7D-3/TRBV26 ⁵	10	77	0	28	17	27	33	51	5	16	40

¹TRAV7D-4/TRBV19: Clon ESO (1 estim. LPS) B (Tabla 2 anterior)
²TRAV13D-2/TRBV14: Clon ESO (1 estim. LPS) H (Tabla 2 anterior)
³TRAV7D-3/TRBV14: Clon ESO (3 estim. LPS) 5 (Tabla 5 anterior)
⁴TRAV6D/TRBV26: Clones ESO (3 estim. LPS) 6 ESO (3 estim T2) 1; (3 estim. T2) 63 (Tabla 5 anterior)
⁵TRAV7D-3/TRBV26: Clon ESO (3 estim. T2) 50 (Tabla 5 anterior)

Como se muestra en la Tabla 6, el TCR TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12) proporcionó la reactividad anti-NY-ESO-1 específica más alta y se eligió para un estudio adicional.

5 La secuencia de nucleótidos (ARN) que codifica el TCR TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12) se transfectó en PBMC humanas de los pacientes 3 y 4. Las células transfectadas se seleccionaron positivamente para las células CD8+ y CD4+, se estimularon con OKT3 e IL 2, y cultivadas solas (medios) o co-cultivadas con células T2 pulsadas con péptido de control (HBV), células T2 pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺), COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻), o una de varias líneas celulares de tumor de melanoma 888mel (NY-ESO-1⁻), Sk23mel (NY-ESO-1⁻), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺), o 624 (NY-ESO-1⁺). Se midió la
10 secreción de IFN γ y los resultados se muestran en la Tabla 7 (IFN γ (pg/ml)).

TABLA 7

CD8+	T2+HBV 10 ⁻⁶ g/ml	T2+ESO:157-165						medio	888 A2-	SK23 A2+	A375 A2+	624 A2+	1363 A2+	COS- A2 CEA A2+	COS-A2 ESO A2+
		10 ⁻¹² g/ml	10 ⁻¹¹ g/ml	10 ⁻¹⁰ g/ml	10 ⁻⁹ g/ml	110 ⁻⁸ g/ml	10 ⁻⁷ g/ml								
Paciente 3															
TRAV6D/ TRBV26	243	238	1075	4257	6170	8996	5087	6142	122	90	419	125	1194	56	1041
GFP	86	47	27	29	9	17	18	25	12	19	18	1	27	11	20
CD4+															
TRAV6D/ TRBV26	127	67	69	1836	12835	19161	12495	14641	173	56	250	84	361	30	179
Avidex	6	0	1	40	1147	2455	3538	5783	17	0	25	9	26	10	14
GFP	10	0	0	0	0	0	0	0	10	5	43	18	47	4	7
Paciente 4															
CD8+															
TRAV6D/ TRBV26	15	55	931	1713	2670	3721	2986	2878	0	0	48	15	262	0	380
GFP	42	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	2	0
CD4+															
TRAV6D/ TRBV26	38	1	58	5774	18051	19691	>20000	>20000	21	7	109	36	476	2	241
Avidex	25	0	0	200	2923	15574	>20000	18293	8	0	37	0	60	0	23
GFP	12	0	0	0	0	0	10	30	0	0	28	14	42	0	0

Como se muestra en la Tabla 7, las células transfectadas con TCR TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12) reconocieron específicamente células de tumor de melanoma NY-ESO-1+, según se midió mediante la secreción de IFN γ .

5 Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células T CD8+ y CD4+ humanas transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con el péptido NY-ESO-1.

10 Las células T humanas CD8+ (Figura 1A) o CD4+ (Figura 1B) se transfectaron con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) o un anti-NY-ESO humano 1 TCR. Las células transfectadas se cultivaron conjuntamente con células dendríticas pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, y se midió la secreción de IFN γ .

15 Como se muestra en las Figuras 1A y 1B, las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) fueron reactivas contra células dendríticas pulsadas con péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, medido por la secreción de IFN γ . Las células T humanas CD8+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) fueron más reactivas contra las células dendríticas pulsadas con péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, medido por la secreción de IFN γ , en comparación con las células CD8+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 humano.

Ejemplo 5

25 Este ejemplo demuestra la reactividad de las células T CD8+ y CD4+ humanas transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino después del cultivo conjunto con células de tumor de melanoma.

30 Las células T humanas CD8+ (Figura 2A) o CD4+ (Figura 2B) se transfectaron con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) o un TCR anti-NY-ESO humano 1. Las células transfectadas se cultivaron solas (medios) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control, células T2 pulsadas con péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻), COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺), o una de varias líneas celulares de tumor de melanoma 888mel (NY-ESO-1⁻), Sk23mel (NY-ESO-1⁻), A375mel (NY-ESO-1⁺), o 1363mel (NY-ESO-1⁺). Se midió la secreción de IFN γ .

35 Como se muestra en las Figuras 2A y 2B, las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) reconocieron específicamente las células de tumor de melanoma NY-ESO-1+, según se midió mediante la secreción de IFN γ . Las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26 (SEQ ID NO: 11 y 12)) fueron más reactivas contra las líneas de células tumorales NY-ESO-1+, según se midió mediante la secreción de IFN γ , en comparación con las células CD8+ y CD4+ transfectadas con un TCR anti-NY-ESO-1 humano.

40 Ejemplo 6

45 Este ejemplo demuestra la reactividad de las células T CD8+ y CD4+ humanas transfectadas con una secuencia de nucleótidos con codones optimizados o de tipo salvaje que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino después del cultivo conjunto con células de tumor de melanoma.

50 Se transfectó una secuencia de nucleótidos (ARN) de tipo salvaje (SEQ ID NO: 19 y 20) o con codones optimizados (SEQ ID NO: 15 y 16) que codifica el TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) en PBMC humanas CD8+ o CD4+ de los pacientes 5 y 6. Las células transfectadas se seleccionaron positivamente para las células CD8+ y CD4+, se estimularon con OKT3 e IL-2 y se cultivaron solas (medios) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con péptido de control (HBVc), células T2 pulsadas con diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻), COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺), o una de varias líneas celulares de tumor de melanoma 888mel (NY-ESO-1⁻), Sk23mel (NY-ESO-1⁻), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺), A375 (NY-ESO-1⁺), o 624mel (NY-ESO-1⁺). Se midió la secreción de IFN γ . Los resultados se muestran en la Tabla 8 (IFN γ (pg/ml)).

55

TABLA 8

	Paciente 5 CD4				Paciente 5 CD8				Paciente 6 CD4				Paciente 6 CD8			
	Codón optimizado	tipo salvaje	GFP		Codón optimizado	tipo salvaje	GFP		Codón optimizado	tipo salvaje	GFP		Codón optimizado	tipo salvaje	GFP	
medio	103	62	6		43	60	1		0	0	0		0	0	0	3
T2+HBVc	58	37	4		71	108	82		2	17	7		3	12	9	8
T2+10 ⁻¹² M ESO	44	32	0		67	86	46		13	15	6		6	9	14	0
T2+10 ⁻¹¹ M ESO	83	42	0		52	150	30		15	22	7		20	23	2	0
T2+10 ⁻¹⁰ M ESO	69	27	3		221	175	43		13	18	4		193	176	0	0
T2+10 ⁻⁹ M ESO	232	60	0		3149	2465	20		728	555	6		1979	3066	4	0
T2+10 ⁻⁸ M ESO	5158	2979	0		13308	13394	56		15468	12906	7		5382	11217	0	0
T2+10 ⁻⁷ M ESO	13987	9362	1		>20000	>20000	37		23981	21321	8		8914	13127	0	0
T2+10 ⁻⁶ M ESO	15345	9417	0		>20000	>20000	51		26802	25225	8		14734	19766	2	0
888mel (A2- ESO-)	54	30	8		55	98	37		22	9	8		36	58	37	17
Sk23mel (A2+ ESO-)	30	34	7		8	26	28		3	0	3		8	29	11	0
A375 (A2+ ESO+)	239	204	75		525	925	55		114	146	82		190	480	22	0
624mel (A2+ ESO+)	102	81	57		176	211	24		44	42	6		89	125	0	0
1363mel (A2+ ESO+)	605	443	176		964	1421	28		525	576	153		426	1079	20	nt
COS-A2-CEA	68	66	22		51	83	39		8	17	16		4	13	9	4
COS-A2-ESO	429	92	2		1322	1436	22		1213	431	17		872	1372	10	0

Como se muestra en la Tabla 8, las células T humanas CD8+ y CD4+ transfectadas con una secuencia de nucleótidos con codones optimizados o de tipo salvaje que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) reconocieron específicamente las células de tumor de melanoma NY-ESO-1+, según se midió mediante la secreción de IFN γ .

5

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células T CD8+ humanas transfectadas con una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino después del cultivo conjunto con células de tumor de melanoma y no melanoma.

10

Una secuencia de nucleótidos (ARN) (SEQ ID NO: 19 y 20) que codifica el TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) se introdujo mediante electroporación en células T humanas CD8+ de los pacientes 7 y 8. Las células no transfectadas (simulacro) o las células transfectadas se seleccionaron positivamente para las células T CD8+, se estimularon con OKT3 e IL-2 y se cultivaron solas (medios) o se cultivaron conjuntamente con células T2 pulsadas con el péptido de control (HBVc); las células T2 pulsadas con varias concentraciones de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅; COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁺); COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺); una de varias líneas celulares de tumor de melanoma 888mel (NY-ESO-1⁺), Sk23mel (NY-ESO-1⁺), A375mel (NY-ESO-1⁺), 1363mel (NY-ESO-1⁺), A375 (NY-ESO-1⁺); línea celular de sarcoma osteogénico Saos2 (NY-ESO-1⁺); línea celular de glioma LN-18 (NY-ESO-1⁺); línea celular de sarcoma de Ewing TC-71 (NY-ESO-1⁺); líneas celulares de neuroblastoma SKN AS (NY-ESO-1⁺) o SKN AS-A2 (NY-ESO-1⁺); o líneas celulares de cáncer de mama MDA 453S (NY-ESO-1⁺) o MDA 453S-A2 (NY-ESO-1⁺). Se midió la secreción de IFN γ . Los resultados se muestran en la Tabla 9 (IFN γ (pg/ml)).

20

Tabla 9

		--Paciente 7 CD8 ---		--Paciente 8 CD8 ---		
		ESO a/b	simulacro	ESO a/b	simulacro	medio
media		21	0	0	6	0
T2 + HBVc		64	60	88	50	0
T2 + 10-12 M ESO		50	58	107	59	0
T2 + 10-11 M ESO		66	51	<u>209</u>	71	0
T2 + 10-10 M ESO		<u>332</u>	66	<u>1704</u>	50	0
T2 + 10-9 M ESO		<u>3142</u>	51	<u>10886</u>	55	0
T2 + 10-8 M ESO		<u>6505</u>	52	<u>>20000</u>	58	0
T2 + 10-7 M ESO		<u>6764</u>	42	<u>>20000</u>	51	0
T2 + 10-6 M ESO		<u>6550</u>	55	<u>>20000</u>	58	0
888mel (A2-ESO -)	melanoma	59	45	142	133	0
Sk23mel (A2 + ESO-)	melanoma	79	54	31	59	0
A375mel (A2 + ESO +)	melanoma	<u>2986</u>	240	<u>1984</u>	93	0
1363mel (A2 + ESO +)	melanoma	<u>1889</u>	119	<u>9858</u>	137	0
Saos2 (A2 + ESO +)	sarcoma osteogénico	<u>248</u>	34	<u>1253</u>	28	0
LN-18 (A2 + ESO +)	glioma	123	21	224	34	0
TC-71 (A2 + ESO +)	sarcoma de Ewing	<u>159</u>	116	183	127	3
SKN AS (A2-ESO +)	neuroblastoma	542	328	199	207	2
SKN AS - A2 (A2 + ESO +)	neuroblastoma	148	38	<u>1004</u>	39	0
MDA 453S (A2-ESO +)	cáncer de mama	448	311	177	230	0
MDA 453S -A2 (A2 + ESO +)	cáncer de mama	111	50	<u>610</u>	39	0
COS-A2-CEA (A2 + ESO-)		45	51	50	63	7
COS-A2-ESO (A2 + ESO +)		<u>588</u>	34	<u>4109</u>	63	0

25 Como se muestra en la Tabla 9, las células T humanas CD8+ transfectadas con una secuencia de nucleótidos que

codifica un TCR murino anti-NY-ESO-1 (TRAV6D/TRBV26) reconocieron específicamente el melanoma NY-ESO-1+, el sarcoma osteogénico, el sarcoma de Ewing, el neuroblastoma y células tumorales de cáncer de mama, según se midió por la secreción de IFN γ .

5 Ejemplo 8

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

10 Un vector retroviral que comprendía ADN que codifica TCR anti-NY-ESO-1 humano de tipo salvaje (1G4), TCR 1G4 que tiene una doble sustitución dentro de la cadena CDR3 α en la que la leucina y la tirosina se sustituyen por treonina en la posición 95 (1G4-LY) (Robbins et al., J. Clin. Oncol., 29: 917-924 (2011); Robbins et al., J. Immunol., 180: 6116-6131 (2008)), o TCR anti-NY-ESO-1 murino (TRAV6D/TRBV26) (SEQ ID NO: 11 y 12) se clonó en un esqueleto retroviral MSGVI y se transformó en células TOP10. Un péptido 2A de picornavirus (SEQ ID NO: 13) conectaba las cadenas alfa y beta. Se prepararon dos vectores que codifican el TRAV6D/TRBV26 TCR murino: uno contenía la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa localizada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta (mESO $\alpha\beta$) (SEQ ID NO: 17), y uno contenía la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena beta localizada 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena alfa (mESO $\beta\alpha$) (SEQ ID NO: 18). La presencia de los insertos que codifican las cadenas alfa y beta del TCR se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción *Nco* I y *Not* I. El ADN se generó a partir de un clon para cada uno de los TCR humanos y murinos mediante maxiprep.

20 El ADN de los vectores 1G4 TCR y 1G4-LY se transfectó a células 293GP para recoger el sobrenadante y transducir PBL en experimentos de transducción posteriores. Se utilizó un vector que codifica GFP como control.

25 Ejemplo 9

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

30 Los linfocitos de la sangre periférica (PBL) se estimularon con OKT3 en el día 0 (S1). Los PBL se transdujeron con el vector TCR 1G4, 1G4-LY, mESO $\alpha\beta$ o mESO $\beta\alpha$ del Ejemplo 8 en los días 3 y 4. Los días 7-11, se evaluó la eficacia de la transducción mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se utilizaron un anticuerpo que reconoce la región variable del TCR murino (VB13.1) y un anticuerpo que reconoce la región constante del TCR murino (mB) para la FACS. La FACS se realizó de 7 a 11 días después de la primera estimulación (S1D7-S1D11).
35 Los resultados se resumen en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10

	% de células VB13.1, mB+ pre-expansión rápida (REP) (para 5 donantes) (S1D7-S1D11)
No transducido (UT)	0-6
Proteína verde fluorescente (GFP)	67-90,5
TCR 1G4	62-85
TCR 1G4-LY	37-85
TCR mESO $\alpha\beta$	56-90
TCR mESO $\beta\alpha$	56-91

40 Como se muestra en la Tabla 10, los PBL transducidos con el vector de TCR mESO $\alpha\beta$ o mESO $\beta\alpha$ se transdujeron con una eficacia similar en comparación con los vectores que codifican los TCR 1G4 y 1G4-LY.

40 Ejemplo 10

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

45 Los PBL de cinco donantes se estimularon y o bien no se transdujeron o bien se transdujeron con vectores que codifican GFP o el TCR 1G4-LY, mESO $\alpha\beta$ o mESO $\beta\alpha$ como se describe en el Ejemplo 9. Los PBL transducidos se cultivaron conjuntamente con una de las diversas líneas de células tumorales enumeradas en la Tabla 11A o 11B debajo o con células T2 pulsadas con péptido SSX, sin péptido (T2), o una de las diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ enumerado en la Tabla 12 a continuación. La secreción de IFN γ se midió mediante un

50

ES 2 718 474 T3

ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de sobrenadante de 24 horas a partir de cultivo conjuntos. El ELISA se realizó 6, 7 o 10 días después de la primera estimulación (S1D6, S1D7 y S1D10). Los resultados se muestran en las Tablas 11A, 11B y 12 (IFN γ pg/ml). La eficacia de la transducción (Td) se basó en el análisis FACS de células V β 13.1 + m β +.

5

Tabla 11A

	% eficacia de td	888	938	COS-A2- gp100	624.38	H 1299- A2	A375	COAS-A2- ESO	1300	
Paciente 1 (Dilución 1:10; S1D7)										
No transducido (UT)	N/A	12	0	99	22	17	132	24	61	
GFP	90	0	0	91	17	65	95	0	33	
TCR 1G4-LY	85	13	0	99	3316	8592	3059	1391	5732	
TCR mESO $\alpha\beta$	83	239	284	156	5523	9616	4430	1872	6922	
TCR mESO $\beta\alpha$	83	329	326	42	6721	9898	4178	2270	7798	
Paciente 2 (Dilución 1:5; S1D7)										
No transducido (UT)	N/A	44	43	46	44	42	53	46	42	
GFP	67	42	42	43	44	40	50	41	41	
TCR 1G4-LY	63	53	43	44	346	1446	451	132	352	
TCR mESO $\alpha\beta$	56	43	44	45	372	1259	415	108	323	
TCR mESO $\beta\alpha$	56	43	46	45	327	1236	412	136	625	
Paciente 3 (Dilución 1: 5; S1D10)										
No transducido (UT)		N/A	0	0	0	0	0	48	39	-
GFP		63	0	0	0	0	0	0	0	-
	% eficacia de td	888	938	COS-A2- gp100	624.38	H1299-A2	A375	COAS-A2- ESO	1300	
TCR 1G4-LY	76	0	305	0	546	770	1020	332	-	
TCR mESO $\alpha\beta$	63	0	0	0	111	38	292	13	-	
TCR mESO $\beta\alpha$	60	0	0	0	413	540	819	283	-	

Tabla 11B

Paciente 4 (Dilución 1:5; S1D6)									
	% eficacia de Td	Medio	888	938	COS-A2 GP100	624.38	H1299- A2	A375	COS-A2- ESO
No transducido (UT)	N/A	52	155	35	294	195	122	476	212
GFP	91%	34	91	22	78	106	62	306	50
TCR 1G4-LY	75%	86	113	54	313	2172	7187	1671	2394
TCR mESO $\alpha\beta$	84%	41	131	98	185	1946	5744	1064	1490
TCR mESO $\beta\alpha$	85%	52	130	110	164	2812	7163	1262	1676
Paciente 5 (Dilución 1:5; S1D6)									
No transducido (UT)	N/A	42	23	12	88	9	8	107	64
GFP	87%	15	20	15	76	0	11	98	62
TCR 1G4-LY	25%	63	16	10	20	1172	3156	918	430
TCR mESO $\alpha\beta$	74%	19	55	22	57	444	917	233	372

Paciente 5 (Dilución 1:5; S1D6)									
TCR mESOβα	74%	15	32	20	24	<u>810</u>	<u>2417</u>	<u>603</u>	<u>380</u>

Tabla 12

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

Las células transducidas con los vectores mESOαβ o mESOβα TCR reconocieron específicamente las líneas celulares tumorales diana NY-ESO-1⁺/HLA-A*0201⁺ pero no las líneas celulares HLA-A*0201⁺/NY-ESO-1⁺ o HLA-A*0201⁺/NY-ESO-1⁻ según se midió mediante la secreción de IFNγ (Tablas 11A y 11B). Las células transducidas con los vectores de TCR mESOαβ o mESOβα reconocieron específicamente las células T2 pulsadas con el péptido NY-ESO-1 según se midió mediante la secreción de IFNγ (Tabla 12). El reconocimiento específico de NY-ESO-1 fue uniforme entre las células de cinco donantes diferentes. La funcionalidad de las células transducidas con el TCR anti-NY-ESO-1 murino fue comparable con la de las células transducidas con el TCR anti-NY-ESO-1 humano. La funcionalidad de las células transducidas con el vector de TCR mESOβα fue ligeramente superior en comparación con la de las células transducidas con el vector de TCR mESOαβ. Los PBL transducidos con los vectores de TCR mESOαβ o mESOβα reconocieron las células T2 pulsadas con tan poco como 1 ng/mL, lo que indica que ambos mTCR son receptores de avidéz relativamente alta. El cultivo conjunto de PBL que expresan los vectores de TCR mESOαβ o mESOβα con células T2 de control que no se pulsaron con ningún péptido produjo niveles de fondo de IFN-γ. Las células del paciente 1 transducidas con TCR mESOβα tenían niveles más altos de secreción de IFN-γ en comparación con las células transducidas con TCR mESOαβ para el mismo nivel de péptido. Las células del paciente 2 transducidas con TCR mESOβα tuvieron niveles más altos de secreción de IFN-γ en comparación con las células transducidas con TCR mESOαβ para el mismo nivel de péptido para concentraciones de péptidos de 1 µg/ml, 100 ng/ml y 0,1 ng/ml.

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra que las células transducidas con un vector que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino mantienen la expresión del TCR anti-NY-ESO-1 murino después de la expansión del número de células.

Los PBL de dos donantes fueron estimulados y o bien no transducidos o bien transducidos con vectores que codifican GFP o los TCR 1G4, 1G4-LY, mESOαβ o mESOβα como se describe en el Ejemplo 9. El número de PBL se expandió como describen en Riddell et al., en *Science*, 257: 238-241 (1992) y Dudley et al., en *Cancer J. Sci. Am.*, 6: 69-77 (2000). En general, el número de PBL se expandió hasta 3 registros utilizando OKT3 soluble, células alimentadoras irradiadas e IL-2 de dosis alta. La expresión de TCR anti-NY-ESO-1 murino mediante el número expandido (expandido una vez) de células se midió mediante FACS dos veces (los días 10 y 20). Los resultados se resumen en la Tabla 13 (% de células VB13.1, mB+ después de la expansión).

Tabla 13

Donante	1		2	
	D10	D20	D10	D20
UT	0	<1	0	<1
GFP	88	87	42	70
TCR 1 G4	59	80	50	59
TCR 1G4-LY	76	88	37	60
TCR mESOαβ	82	76	62	46
TCR mESOβα	82	74	62	50

Como se muestra en la Tabla 13, la PBL transducida con el vector de TCR mESOαβ o mESOβα mantuvo la expresión del TCR anti-NY-ESO-1 murino después de la expansión del número de células.

5

Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra que las células transducidas con un vector que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino mantienen la funcionalidad después de la expansión del número de células transducidas.

10

Los PBL de dos donantes fueron estimulados y o bien no transducidos o bien transducidos con vectores que codifican GFP o el TCR 1G4-LY, mESOαβ o mESOβα como se describe en el Ejemplo 9. El número de células transducidas se expandieron como se describe en el Ejemplo 11. Se cultivaron PBL expandidos transducidos solo (medio) o co-cultivados con una de las diversas líneas de células tumorales enumeradas en la Tabla 14 a continuación o con células T2 pulsadas con péptido SSX, sin péptido (T2), o una de las diversas concentraciones de péptido NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ enumerado en la Tabla 15 a continuación. La secreción de IFNγ se midió mediante ELISA nueve días después de la segunda estimulación (S2D9). Los resultados se muestran en las Tablas 14 y 15 (IFNγ pg/ml; Dilución 1:10).

15

Tabla 14

	% eficacia de td	Medio	888	938	COS-A2-gp100	624.38	H1299-A2	A375	COAS- A2- ESO	1300
Paciente 1										
No transducido (UT)	N/A	282	181	91	515	78	128	779	-	91
GFP	88	95	87	44	216	44	48	783	-	53
TCR 1G4-LY	76	208	184	105	260	<u>8233</u>	<u>12848</u>	<u>6454</u>	-	<u>2786</u>
TCP mESOαβ	82	129	183	111	121	<u>8132</u>	<u>11976</u>	<u>6152</u>	-	<u>3035</u>
TCR mESOβα	82	92	194	130	148	<u>9104</u>	<u>11381</u>	<u>6226</u>	-	<u>2654</u>
Paciente 2										
(UTAH)	N/A	297	276	195	231	151	144	353	-	167
GFP37	42	393	380	205	272	146	186	465	-	168
TCR 1G4-LY	37	102	174	53	133	<u>4571</u>	<u>5984</u>	<u>2420</u>	-	<u>2066</u>
TCR mESOαβ	62	125	397	362	170	<u>7382</u>	<u>9590</u>	<u>4681</u>	-	<u>3439</u>
TCR mESOβα	62	137	323	370	130	<u>6345</u>	<u>8250</u>	<u>4236</u>	-	<u>3054</u>

20

Tabla 15

	% eficacia de td	SSX	T2	1 µg/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml	0.1 ng/ml
Paciente 1								
No transducido (UT)	N/A	365	479	123	113	168	168	231
GFP	88	0	30	0	0	0	0	0
TCR 1G4	59	179	275	<u>26446</u>	<u>19424</u>	<u>13530</u>	<u>6988</u>	<u>1277</u>
TCR 1G4-LY	76	185	217	<u>30639</u>	<u>21553</u>	<u>16246</u>	<u>7261</u>	<u>1328</u>
TCR mESOαβ	82	511	516	<u>26427</u>	<u>22062</u>	<u>16950</u>	<u>8601</u>	<u>1873</u>
TCR mESOβα	82	399	384	<u>27813</u>	<u>23052</u>	<u>16872</u>	<u>8076</u>	<u>2174</u>
Paciente 2								
No transducido (UT)	N/A	976	1281	886	616	680	782	764
GFP	42	660	912	505	697	726	591	763
TCR 1G4	50	279	364	<u>19505</u>	<u>12698</u>	<u>7350</u>	<u>3553</u>	<u>747</u>
TCR 1G4-LY	37	150	110	<u>19416</u>	<u>10632</u>	<u>6799</u>	<u>2495</u>	<u>662</u>
TCR mESOαβ	62	386	460	<u>19960</u>	<u>13887</u>	<u>9970</u>	<u>4488</u>	<u>1025</u>
TCR mESOβα	62	379	611	<u>16434</u>	<u>12708</u>	<u>9646</u>	<u>5266</u>	<u>1177</u>

5 La funcionalidad de las células transducidas expandidas también se evaluó mediante un ensayo de liberación de cromo. Las células transducidas expandidas (células efectoras) se cultivaron conjuntamente con células de melanoma diana células 624.38 (Tabla 16A) o células A375 (Tabla 16B) a varias razones de células efectoras:diana (E:T), y se midió el porcentaje de células diana lisadas. Los resultados se muestran en las Tablas 16A y 16B (porcentaje de células diana lisadas).

Tabla 16A

Razón E:T	TCR 1G4-LY	TCR mESOα/β	TCR mESOβ/α	GFP
40 : 1	71,0	69,0	68	20,0
13 : 1	59,0	64,0	62	13,0
4 : 1	54,0	73,0	46	23,0
1,5 : 1	42,0	40,0	39	2,0

Tabla 16B

Razón E:T	TCR 1G4-LY	mESO α/β	mESO β/α	GFP
40 : 1	43,0	49,0	51	21,0
13 : 1	43,0	47,0	50	16,0
4 : 1	36,0	28,0	32	8,0
1,5 : 1	29,0	31,0	32	6,0

10 Como se muestra en las Tablas 14, 15, 16A y 16B, las células transducidas con un vector que codifica un TCR anti-NY-ESO-1 murino mantuvieron la funcionalidad después de la expansión del número de células transducidas.

Ejemplo 13

15 Este ejemplo demuestra un método para producir clones de células empaquetadoras para la producción de mESOβα TCR para una posible aplicación clínica.

20 El ADN para el vector de TCR mESOβα se usó para producir clones de células de empaquetamiento de vectores retrovirales en las condiciones requeridas para una posible aplicación clínica. Se utilizó el sobrenadante de seis clones de células productoras de PG13 para transducir PBL. El análisis FACS de PBL transducidos utilizando el anticuerpo anti-cadena β de TCR de ratón reveló que cada clon producía un virus que media la transducción positiva

de TCR (Tabla 17). Para evaluar el reconocimiento específico de las células tumorales, los PBL modificados mediante mTCR de cada clon de células productoras de PG13 se cultivaron conjuntamente con un panel de líneas celulares HLA-A*0201⁺ y HLA-A*0201⁻ derivadas de melanoma y tumor de pulmón (Tabla 17). El IFN-gamma se midió mediante ELISA. Una comparación de los seis clones productores de mTCR PG13 mostró que las células T transducidas con el Clon C1 liberaron altos niveles de IFN- γ en respuesta a la diana de células tumorales HLA-A*0201⁺/NY-ESO-1⁺ H1299-A2 y demostraron la mayor eficacia de transducción (Tabla 17). Estas respuestas fueron específicas ya que los niveles de fondo de IFN- γ se liberaron en respuesta a las líneas celulares NY-ESO-1⁺/HLA-A*0201⁻ y las líneas celulares NY-ESO-1⁻/HLA-A*0201⁺ por cada clon (Figura 2). Sobre la base de este análisis, se seleccionó el Clon C1 para la producción de un banco de células maestro para la producción posterior de sobrenadante retroviral de buenas prácticas de fabricación (GMP).

Tabla 17

Clon	% mTCR β	IFN- γ pg/ml				
		medio	888	H1299A2	624.38	A375
UT	4	122	1	0	0	146
B2	30	39	46	2923	670	382
C1	63	0	0	7529	942	257
C12	42	10	0	3332	661	351
D8	36	64	90	5773	675	439
F2	47	31	38	5533	579	488
H4	44	34	38	7185	531	459

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra la eficacia de transducción de las células transducidas con un TCR mESO $\beta\alpha$ utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células empaquetadoras del Ejemplo 13.

Para comparar los respectivos TCR NY-ESO-1 (murinos o mTCR, frente a los humanos, o hTCR (1G4-LY TCR)), el análisis de FACS de PBL transducidos con sobrenadante retroviral de clones de células de empaquetamiento utilizando los anticuerpos anti-cadena V β de TCR de ratón y anti-V β 13.1 se realizaron después de una estimulación con OKT3 y después de una segunda expansión a gran escala utilizando el protocolo de expansión rápida (REP) (Tabla 18). Los resultados demostraron que tanto el mTCR como el hTCR tenían porcentajes equivalentes de transducción después de la estimulación, teniendo el mTCR niveles iguales o mayores de transducción después de REP (Tabla 18).

Tabla 18

	% TCR			
	Donante h		Donante e	
	Después de una estimulación con OKT3.	Después de expandir el número de células dos veces	Después de una estimulación con OKT3.	Después de expandir el número de células dos veces
UT	4	13	4	8
TCR 1 G4-LY	52	56	48	44
TCR mESO $\beta\alpha$	56	61	46	66

Ejemplo 15

Este ejemplo demuestra la reactividad de las células transducidas con un TCR mESO $\beta\alpha$ utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células empaquetadoras del Ejemplo 13.

El reconocimiento de cada TCR se evaluó sometiendo las células T transducidas con mTCR y hTCR a un cultivo conjunto con células T2 pulsadas con el péptido NY-ESO-1. Tanto el mTCR como el hTCR secretaron específicamente IFN- γ al encontrarse con el péptido antigénico de una manera dependiente de la dosis después de

5 una estimulación con OKT3 y después REP (Tabla 19). Después de una estimulación, tanto el mTCR como el hTCR reconocieron las células T2 pulsadas con tan solo 0,1 ng/ml, lo que indica que ambos mTCR son receptores de avidéz relativamente alta. Tras la expansión del número de células, el mTCR liberó niveles más altos de IFN- γ en comparación con el vector hTCR de las células T transducidas en cada concentración de péptido (Tabla 19). El cultivo conjunto de PBL que expresaba mTCR NY-ESO-1 o hTCR NY-ESO-1 con células T2 de control que no se pulsaron con ningún péptido produjo niveles de fondo de IFN- γ .

Tabla 19

		IFN- γ pg/ml				
		Donante H (después de la estimulación con OKT3)				
concentración de péptidos	Células T2 sin péptido	0,1 ng/ μ l	1 ng/ μ l	10 ng/ μ l	100 ng/ μ l	
UT	400	380	329	350	285	
GFP	633	455	424	410	412	
TCR 1G4-LY	1259	1400	1710	3016	3775	
TCR mESO $\beta\alpha$	1070	1316	1660	3091	3744	

		IFN- γ pg/ml				
		Donante H (después de expandir el número de células)				
concentración de péptidos	Células T2 sin péptido	0,1 ng/ μ l	1 ng/ μ l	10 ng/ μ l	100 ng/ μ l	
UT	34	47	57	22	28	
GFP	34	47	57	22	28	
TCR 1 G4-LY	24	89	512	2974	4341	
TCR mESO $\beta\alpha$	174	229	1456	6633	10683	

10 Para evaluar el reconocimiento específico de las células tumorales, los PBL diseñados mediante mTCR se cultivaron conjuntamente con un panel de líneas celulares HLA-A*0201⁺ y HLA-A*0201⁻ derivadas de melanoma y tumor de pulmón. La liberación específica de IFN- γ se observó cuando tanto los PBL modificados mediante mTCR y el hTCR se cultivaron conjuntamente con líneas celulares HLA-A*0201⁺/NY-ESO-1⁺ pero no con líneas celulares HLA-A*0201⁻/NY-ESO-1⁺ o HLA-A*0201⁺/NY-ESO-1⁻ (Tabla 20 (se muestran los experimentos representativos)).

Tabla 20

Paciente h					
	H1299-A2	624.38	1300	938	
No transducido (UT)	86	93	118	0	
GFP	83	81	91	0	
TCR 1G4-LY	14549	6171	1507	0	
TCR mESO $\beta\alpha$	8877	4248	1326	0	

Paciente e					
	H1299-A2	624.38	1300	938	
No transducido (UT)	64	72	81	0	
GFP	70	72	63	0	
TCR 1G4-LY	7483	2149	452	0	
TCR mESO $\beta\alpha$	10646	3548	986	0	

15 Ejemplo 16

Este ejemplo demuestra la lisis específica de células de melanoma por células transducidas con un TCR mESO $\beta\alpha$ utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células empaquetadoras del Ejemplo 13.

20

- 5 También se comparó la lisis específica de líneas celulares de melanoma por el mTCR y el hTCR. La capacidad de los PBL transducidos para lisar células tumorales HLA-A*0201⁺/NY-ESO-1⁺ se midieron utilizando un ensayo de bioluminiscencia CYTOTOX-GLO (Promega, Madison, WI). Este ensayo utiliza un sustrato peptídico luminogénico, el sustrato AAF-GLO, para medir la actividad proteasa de células muertas, que se libera de las células que han perdido la integridad de la membrana, lo que da como resultado la generación de una señal luminiscente de "tipo incandescente" que es proporcional al número de células muertas en la muestra. El sustrato AAF-GLO no puede atravesar la membrana intacta de las células vivas y no genera ninguna señal apreciable de la población de células vivas. En estos ensayos, los PBL diseñados por TCR se incubaron conjuntamente con proporciones crecientes de células diana (E:T) en medio AIM-V en placas de 96 pocillos con fondo en U a 37°C durante 4 horas (hr). La lisis se midió mediante liberación de bioluminiscencia en el medio: porcentaje de lisis específica = [(liberación específica - (liberación efectora espontánea + liberación espontánea de la diana))/liberación total de la diana - liberación espontánea de la diana x 100%, promedio de muestras por cuadruplicado. Poca o ninguna lisis celular se mide como un valor negativo.
- 10
- 15 Como se muestra en la Tabla 21, los PBL transducidos tanto con mTCR como con hTCR demostraron una actividad lítica similar contra la línea celular NY-ESO-1⁺/HLA-A*0201⁺ de tumor de melanoma 624.38mel. Hubo poca o ninguna lisis de la línea celular HLA-A*0201⁻ 938 mel, y los PBL transducidos con GFP no mostraron reactividad contra ninguna de las células diana (Tabla 21).

Tabla 21

	Diana positiva: células 624.38		
Efecto: relación objetivo	10:1	30:1	60:1
GFP	-9	-3	-2
TCR 1G4-LY	29	59	58
TCR mESOβα	31	59	60
	Diana negativa: células 938		
Efecto: relación objetivo	10:1	30:1	60:1
GFP	-19	-22	-34
TCR 1 G4-LY	-13	-11	-10
TCR mESOβα	-13	-10	-10

20 Ejemplo 17

Este ejemplo demuestra la actividad antitumoral de las células transducidas con un TCR mESOβα o TCR humano utilizando un sobrenadante retroviral del clon de células empaquetadoras del Ejemplo 13.

- 25 También se investigó la actividad antitumoral de los linfocitos T CD4⁺ transducidos con el mTCR y el hTCR. Los PBL transducidos con hTCR NY-ESO-1 y mTCR NY-ESO-1 se enriquecieron con esferas magnéticas CD4⁺, a continuación se cultivaron conjuntamente durante 16 horas con un panel de líneas celulares HLA-A*0201⁺ y HLA-A*0201⁻ derivadas de melanoma y tumor de pulmón. Los linfocitos T CD4⁺ transducidos con mTCR y hTCR tuvieron una liberación específica de IFN-γ cuando se cultivaron conjuntamente con líneas celulares HLA-A*0201⁺/NY-ESO-1⁺ pero no con líneas celulares HLA-A *0201⁻/ NY-ESO-1⁺ (Tabla 22).
- 30

Tabla 22

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

Ejemplo 18

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

10 Para evaluar el reconocimiento específico de diversas histologías de tumores, los PBL transducidos con mTCR NY-ESO-1 se cultivaron conjuntamente con diferentes líneas celulares HLA-A *0201⁺NY-ESO-1⁺ derivadas de melanoma (A375), cáncer de pulmón de células no pequeñas (H1299-A2), neuroblastoma (SKN AS-A2), cáncer de mama (MDA-435S-A2) y osteosarcoma (Saos2). Se observó liberación específica de IFN- γ (Tabla 23).

Tabla 23

	IFN- γ pg/ml	
	No transducido	TCR mESO $\beta\alpha$
A375	0	5710
H1299-A2	132	21222
MDA-435S-A2	1181	3057
SKN AS-A2	1417	5097
Saos2	117	12092

Ejemplo 19

- 15 Este ejemplo demuestra el reconocimiento de células tumorales tratadas con DAC por PBL transducidos con un TCR mESO $\beta\alpha$.

20 Concentraciones crecientes del agente de desmetilación del ADN 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina; DAC) inducen la expresión de varios antígenos de testículos de cáncer en células de cáncer de pulmón (Rao et al., Ther. Tar. and Chem. Bio., 71: 4192-4204 (2011)). Sin desear estar limitado por una teoría o mecanismo concretos, se cree que el DAC puede, potencialmente, regular la expresión de NY-ESO-1 en las células cancerosas, lo que puede aumentar la capacidad de los TCR para reconocer NY-ESO-1.

25 Se cultivaron conjuntamente PBL transducido con mTCR NY-ESO-1 o no transducido durante 16 horas con las líneas celulares diana tumorales de diferentes histologías (mostradas en las Tablas 24A-24B) que se habían expuesto a DAC a las concentraciones mostradas en las Tablas 24A-24B durante 72 horas. Se midieron los niveles de interferón-gamma. Los resultados se muestran en la Tabla 24A-24B.

Tabla 24a

Cáncer de próstata (células pC3A2)		
Concentración DAC (mM/L)	IFN- γ (pg/ml)	
	No transducido	TCR mESO $\beta\alpha$ del Clon C1
No tratado	159	336
0,1	289	1566
0,5	188	1766
1.0	282	1912
10	361	1520

Tabla 24b

Cáncer colorrectal (células SW480)		
Concentración DAC (mM/L)	IFN- γ (pg/ml)	
	No transducido	TCR mESO $\beta\alpha$ del Clon C1
No tratado	118	135
0,1	141	196
0,5	169	239
1,0	98	255
10	80	388

- 5 Como se muestra en las Tablas 24A y 24B, los PBL transducidos con TCR mESO $\beta\alpha$ demostraron una mayor reactividad hacia el cáncer de próstata y el cáncer colorrectal dianas tratados con DAC, respectivamente, en comparación con las células diana no tratadas.

Ejemplo 20

- 10 Este ejemplo demuestra el reconocimiento de células T2 pulsadas con péptidos NY-ESO-1 sustituidos con alanina por PBL transducidos con el TCR mESO $\beta\alpha$ o TCR humano.

- 15 Se cultivaron conjuntamente PBL humanos no transducidos o PBL humanos transducidos con mTCR (mESO $\beta\alpha$ del clon C1), hTCR (TCR 1G4-LY) o proteína verde fluorescente (GFP) durante 16 horas con células T2 no tratadas o células T2 que se pulsaron previamente con diferentes concentraciones de péptido como se muestra en las Tablas 25A y 25B. Se midió el interferón gamma. Los resultados se muestran en la Tabla 25A y 25B. Como se muestra en las Tablas 25A y 25B, el mTCR reconoce SEQ ID NO: 24, mientras que el hTCR no lo hace. Además, el hTCR reconoce SEQ ID NO: 27, pero el mTCR no lo hace.

Tabla 25A (Donante K)

	péptido pulsado (ng/ μ L)	IFN- γ (pg/ml)			
		No transducido	GFP	TCR 1G4-LY	mESO $\beta\alpha$
Células T2 no tratadas	-	943	358	641	443
SLLMWITQC (SEQ ID NO: 2)	10	0	0	3759	5741
SLLMWITQC (SEQ ID NO: 2)	1	0	0	678	2111
MERCADO	10	0	0	0	0
MERCADO	1	0	0	0	0
SLAMWITQC (SEQ ID NO: 23)	10	0	0	3271	6287
SLAMWITQC (SEQ ID NO: 23)	1	0	0	1785	2421
SLLAWITQC (SEQ ID NO: 24)	10	0	0	0	2701

ES 2 718 474 T3

	péptido pulsado (ng/μL)	IFN-γ (pg/ml)			
		No transducido	GFP	TCR 1G4-LY	mESOβα
SLLA <u>A</u> WITQC (SEQ ID NO: 24)	1	0	0	0	3172
SLLM <u>A</u> ITQC (SEQ ID NO: 25)	10	0	0	0	0
SLLM <u>A</u> ITQC (SEQ ID NO: 25)	1	0	0	0	0
SLLMW <u>A</u> TQC (SEQ ID NO: 26)	10	0	0	1114	1194
SLLMW <u>A</u> TQC (SEQ ID NO: 26)	1	0	0	884	921
SLLMWI <u>A</u> QC (SEQ ID NO: 27)	10	0	0	5672	0
SLLMWI <u>A</u> QC (SEQ ID NO: 27)	1	0	0	457	0
SLLMWIT <u>A</u> C (SEQ ID NO: 28)	10	0	0	0	0
SLLMWIT <u>A</u> C (SEQ ID NO: 28)	1	0	0	0	0

Tabla 25B (Donante L)

	péptido pulsado (ng/μL)	IFN-γ (pg/ml)			
		No transducido	GFP	TCR 1G4-LY	mESOβα
Células T2 no tratadas	-	162	126	131	188
SLLMWITQC (SEQ ID NO: 2)	10	124	120	754	1168
SLLMWITQC (SEQ ID NO: 2)	1	199	112	184	273
MART	10	230	136	123	102
MART	1	155	152	112	108
SL <u>A</u> MWITQC (SEQ ID NO: 23)	10	145	168	1383	1541
SL <u>A</u> MWITQC (SEQ ID NO: 23)	1	120	139	370	505
SLLA <u>A</u> WITQC (SEQ ID NO: 24)	10	128	121	185	616
SLLA <u>A</u> WITQC (SEQ ID NO: 24)	1	123	111	225	1000
SLLM <u>A</u> ITQC (SEQ ID NO: 25)	10	183	163	294	137
SLLM <u>A</u> ITQC (SEQ ID NO: 25)	1	119	112	148	214
SLLMW <u>A</u> TQC (SEQ ID NO: 26)	10	96	80	297	375
SLLMW <u>A</u> TQC (SEQ ID NO: 26)	1	74	70	220	280
SLLMWI <u>A</u> QC (SEQ ID NO: 27)	10	78	95	1026	76
SLLMWI <u>A</u> QC (SEQ ID NO: 27)	1	123	72	208	86
SLLMWIT <u>A</u> C (SEQ ID NO: 28)	10	78	83	97	76
SLLMWIT <u>A</u> C (SEQ ID NO: 28)	1	85	75	82	74

Lista de secuencias

- 5 <110> LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, REPRESENTADOS POR EL SECRETARIO, DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS
- <120> RECEPTORES DE CÉLULAS T ANTI-NY-ESO-1 MURINOS
- 10 <130> 713415
- <150> US 61/650,020
- <151> 2012-05-22
- 15 <160> 28

ES 2 718 474 T3

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ala Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly
 20 25 30

Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala
 35 40 45

Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro
 50 55 60

His Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala
 65 70 75 80

Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe
 85 90 95

Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp
 100 105 110

Ala Pro Pro Leu Pro Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val
 115 120 125

Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg Gln
 130 135 140

10 Leu Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met
 145 150 155 160

Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser
 165 170 175

Gly Gln Arg Arg
 180

15 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

20 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 718 474 T3

<213> Mus musculus
<400> 3

Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Pro Asn
1 5

5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<400> 4

Val Ile Thr Ala Gly Gln Lys
1 5

15

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

20

<400> 5

Cys Ala Leu Trp Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ile Phe
1 5 10

25

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

30

<400> 6

Lys Gly His Pro Val
1 5

35

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

40

<400> 7

Phe Gln Asn Gln Glu Val
1 5

45

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Cys Ala Ser Arg Asp Ser Pro Glu Gln Tyr Phe
1 5 10

50

<210> 9
<211> 136
<212> PRT
<213> Mus musculus

55

<400> 9

ES 2 718 474 T3

Met Thr Leu Lys Met Asp Ser Ser Pro Gly Phe Val Ala Val Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Ile Leu Gly Arg Thr His Gly Asp Ser Val Thr Gln Thr Glu Gly
 20 25 30

Gln Val Thr Val Ser Glu Ser Lys Ser Leu Ile Ile Asn Cys Thr Tyr
 35 40 45

Ser Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Pro Asn Leu Phe Trp Tyr Val Arg Tyr
 50 55 60

Pro Gly Glu Gly Leu Gln Leu Leu Leu Lys Val Ile Thr Ala Gly Gln
 65 70 75 80

Lys Gly Ser Ser Arg Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Asn Lys Glu Ala Thr
 85 90 95

Ser Phe His Leu Gln Lys Ala Ser Val Gln Glu Ser Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ile Phe Gly Ser
 115 120 125

Gly Thr Gln Leu Thr Val Met Pro
 130 135

5

<210> 10
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10

ES 2 718 474 T3

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

Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His
 35 40 45

Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe
 50 55 60

Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
 65 70 75 80

Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
 85 90 95

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

Ser Arg Asp Ser Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
 115 120 125

Val Leu Glu
 130

<210> 11
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 11

Met Thr Leu Lys Met Asp Ser Ser Pro Gly Phe Val Ala Val Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Ile Leu Gly Arg Thr His Gly Asp Ser Val Thr Gln Thr Glu Gly
 20 25 30

Gln Val Thr Val Ser Glu Ser Lys Ser Leu Ile Ile Asn Cys Thr Tyr
 35 40 45

10

ES 2 718 474 T3

Ser Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Pro Asn Leu Phe Trp Tyr Val Arg Tyr
50 55 60

Pro Gly Glu Gly Leu Gln Leu Leu Lys Val Ile Thr Ala Gly Gln
65 70 75 80

Lys Gly Ser Ser Arg Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Asn Lys Glu Ala Thr
85 90 95

Ser Phe His Leu Gln Lys Ala Ser Val Gln Glu Ser Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ile Phe Gly Ser
115 120 125

Gly Thr Gln Leu Thr Val Met Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala
130 135 140

Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu
145 150 155 160

Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser
165 170 175

Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp
180 185 190

Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr
195 200 205

Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp
210 215 220

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

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

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

Ser

<210> 12
<211> 303
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 12

5

ES 2 718 474 T3

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

Arg Ile Leu Asn Ser Lys Val Ile Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Lys
20 25 30

Gly Gln Gly Gln Lys Ala Lys Met Arg Cys Ile Pro Glu Lys Gly His
35 40 45

Pro Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Asn Lys Asn Asn Glu Phe Lys Phe
50 55 60

Leu Ile Asn Phe Gln Asn Gln Glu Val Leu Gln Gln Ile Asp Met Thr
65 70 75 80

Glu Lys Arg Phe Ser Ala Glu Cys Pro Ser Asn Ser Pro Cys Ser Leu
85 90 95

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

Ser Arg Asp Ser Pro Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
115 120 125

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

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

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp
165 170 175

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

Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val
195 200 205

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

Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro
225 230 235 240

ES 2 718 474 T3

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

Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr
 260 265 270

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

Val Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
 290 295 300

5 <210> 13
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 13

Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20 25

15 <210> 14
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 14

agggccaaac gctcaggag cggagctacc aatthttctc tgctgaagca ggccggcgat 60

25 gtggaggaaa atcctgggcc a 81

30 <210> 15
 <211> 825
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética

35 <400> 15

atgacactga aaatggactc aagccctgga ttcgtggctg tcatcctgct gattctgggc 60

cggactcacg gggatagcgt gaccagaca gagggccagc tgaccgtctc cgaatctaag 120

ES 2 718 474 T3

agctctgatca ttaactgtac ctactccgcc acatctatcg ggtatcctaa tctgttctgg 180
 tacgtgcgct atccaggcga ggggctgcag ctgctgctga aagtcattac cgctgggcag 240
 aagggatcct ctcgaggatt cgaggcaaca tacaacaaag aagccacttc atttcatctg 300
 cagaaggcaa gcgtgcagga atcagatagc gccgtgtact attgcgcact gtggtccggc 360
 tcttggcagc tgatctttgg atccggcacc cagctgacag tgatgcccga cattcagaac 420
 cccgagcctg ccgtctatca gctgaaggac cctcgaagtc aggatagcac cctgtgcctg 480
 ttcaccgact ttgattccca gatcaatgtg cccaaaacaa tggaatctgg cactttcatt 540
 accgacaaga cagtctgga tatgaaagct atggacagta agtcaaacgg ggcaatcgcc 600
 tggagcaatc agacttcctt cacctgccag gatatcttca aggagacaaa cgcaacttac 660
 cccagttcag acgtgccttg tgatgccact ctgaccgaga agagcttcga aaccgacatg 720
 aacctgaatt ttcagaatct gagcgtgatg ggcctgcgca tcctgctgct gaaggtggct 780
 gggttcaatc tgctgatgac actgagactg tggagtagtt gataa 825

<210> 16
 <211> 909
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 16
 atggccacac gcctgctgtg ctacactgtg ctgtgcctgc tgggggctcg catcctgaac 60
 tcaaaagtca tccagacacc tcgctacctg gtcaaaggcc aggggcagaa agccaagatg 120
 agatgcatcc ctgagaaggg gcacccagtg gtcttctggt accagcagaa caaaaacaat 180
 gagttcaagt ttctgatcaa ctttcagaat caggaagtgc tgcagcagat tgatatgacc 240
 gagaagcggg tctcagccga atgcccaagc aattccccct gtagcctgga gatccagagc 300
 tccgaagccg gcgatagcgc cctgtacctg tgcgctagca gagactcccc agagcagtat 360
 tttggacccg gcacaagact gactgtgctg gaagacctga ggaacgtgac tccccctaaa 420
 gtctctctgt tcgagcctag taaggctgaa atcgcaaaca agcagaaggc caccctggtg 480
 tgcctggcta ggggcttctt tccagatcac gtggagctgt cctggtgggt caacgggaaa 540
 gaagtgcatt ctggagtcag tacagacccc caggcttaca aggagtcaaa ttacagctat 600
 tgcctgtcta gtcggctgag agtgtctgca actttttggc acaaccacg aatcatttc 660
 cgggtgcagg tgcagtttca cggactgtcc gaggaagata aatggcccga gggctctcca 720
 aagcccgta cacagaacat cagtgccgaa gcttggggac gagctgactg cggaattact 780
 tctgcaagtt atcatcaggg cgtgctgtcc gcaaccatcc tgtacgagat tctgctgggg 840
 aaggcaacac tgtatgccgt gctggtcagt ggactggtgc tgatggctat ggtgaagaag 900
 aagaacagc 909

15

<210> 17
 <211> 1815
 <212> ADN

ES 2 718 474 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética

5

<400> 17

atggccctga	aaatggactc	tagccctggg	tttgtcgccg	tcatcctgct	gatcctgggg	60
agaactcacg	gagatagcgt	cactcagacc	gaaggacagg	tgacagtcag	cgagtccaag	120
tctctgatca	ttaaactgcac	atacagcgcc	acttccatcg	gctatcctaa	tctgttttgg	180
tacgtgaggt	atccaggcga	agggctgcag	ctgctgctga	aggtcattac	tgctgggcag	240
aaaggaagct	cccgcggcct	cgaggctact	tacaacaagg	aagcaacctc	atltcaacctg	300
cagaaagcaa	gcgtgcagga	gagtgattca	gcagtctact	attgcgcact	gtggagcgga	360
tcctggcagc	tgatctttgg	aagcggcact	cagctgaccg	tgatgcccg	cattcagaac	420
ccagagcccc	ccgtctatca	gctgaaggac	cctaggctctc	aggatagcac	cctgtgcctg	480
ttcacagact	ttgattcaca	gatcaatgtg	cctaagacaa	tggagtccgg	cacattcatt	540
actgacaaaa	ccgtcctgga	tatgaaggct	atggactcta	aaagtaacgg	ggccatcgct	600
tggagcaatc	agacatcctt	cacttgccag	gatatcttca	aggagaccaa	cgccacatac	660
ccttctagtg	acgtgccatg	tgatgctacc	ctgacagaga	aaagcttcga	aaccgacatg	720
aacctgaatt	ttcagaacct	gtccgtgatg	ggcctgcgga	tcctgctgct	gaaggtcgcc	780
gggtttaatc	tgctgatgac	tctgagactg	tggtcaagca	gggcaaagcg	gagcgggaagc	840
ggagcaacca	acttctctct	gctgaaacag	gcaggggatg	tggaggaaaa	tcctggacca	900
atggccacac	ggctgctgtg	ctacaccgtg	ctgtgcctgc	tgggagcacg	catcctgaat	960
agcaaagtga	tccagacacc	ccgatatctg	gtcaaaggcc	aggggcagaa	ggccaaaatg	1020
agatgcatcc	ccgagaaggg	acatcctgtg	gtcttctggg	atcagcagaa	caagaacaac	1080
gagttcaaat	ttctgatcaa	cttccagaat	caggaagtgc	tgacagcagat	tgatatgacc	1140
gagaaacgat	tctctgccga	atgcccatcc	aattctccct	gtagtctgga	gatccagtcc	1200
tctgaagccg	gcgatagcgc	cctgtacctg	tgcgcttcac	gcgacagccc	agagcagtat	1260
tttggacccg	gcactagact	gaccgtgctg	gaagacctga	ggaacgtgac	ccccctaag	1320
gtctctctgt	tcgagcctag	taaagtgtga	attgcaaata	agcagaaagc	caccctgggtg	1380
tgcttggtta	ggggcttctt	tccagatcac	gtggagctgt	cctgggtggg	caacggaaaag	1440
gaagtgcatt	ccggcgtctc	tactgacccc	caggcctaca	aagagagtaa	ttactcatat	1500
tgcttgagtt	cacggctgag	agtgctctgct	accttctggc	acaaccacg	aatcatttc	1560
cggtgtcagg	tgacagttca	cggactgtcc	gaggaggata	agtggcccga	gggctctccc	1620
aaacctgtga	cacagaacat	cagtgacaga	gcatggggac	gagctgactg	tggaattact	1680
agtgcatcat	accatcaggg	gggtgctgtcc	gctaccatcc	tgatgagat	tctgctggga	1740
aaggcaacac	tgatgctgtg	gctgggtgtct	gggtgggtgc	tgatggctat	ggtgaaaaag	1800
aagaactcat	gataa					1815

10

ES 2 718 474 T3

<210> 18
 <211> 1815
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 18

```

atggccacac gcctgctgtg ctacactgtg ctgtgcctgc tgggggctcg catcctgaac      60
tcaaaagtca tccagacacc tcgctacctg gtcaaaggcc aggggcagaa agccaagatg      120
agatgcatcc ctgagaaggg gcacccagtg gtcttcttgt accagcagaa caaaaacaat      180
gagttcaagt ttctgatcaa ctttcagaat caggaagtgc tgcagcagat tgatatgacc      240
gagaagcggg tctcagccga atgcccaagc aattccccct gtagcctgga gatccagagc      300
tccgaagccg gcgatagcgc cctgtacctg tgcgctagca gagactcccc agagcagtat      360
tttggaacct gcacaagact gactgtgtgt gaagacctga ggaacgtgac tccccctaaa      420
gtctctctgt tcgagcctag taaggctgaa atcgcaaca agcagaaggc caccctgggt      480
tgcctggcta ggggcttctt tccagatcac gtggagctgt cctgggtggg caacgggaaa      540
gaagtgcatt ctggagttag tacagacccc caggcttaca aggagtcaaa ttacagctat      600
tgcctgtcta gtgggctgag agtgtctgca actttttggc acaaccacg aatcatttc      660
cgggtgcagg tgcagtttca cggactgtcc gaggaagata aatggcccga gggctctcca      720
aagcccgtga cacagaacat cagtgcgaa gcttggggac gagctgactg cggaattact      780
tctgcaagtt atcatcaggg cgtgctgtcc gcaaccatcc tgtacgagat tctgctgggg      840
aaggcaacac tgtatgccgt gctggtcagt ggactgggtg tgatggctat ggtgaagaag      900
aagaacagca gggccaaacg ctcagggagc ggagctacca atttttctct gctgaagcag      960
gccggcgatg tggaggaaaa tcctgggcca atgacactga aaatggactc aagccctgga     1020
ttcgtggctg tcatcctgct gattctgggc cggactcacg gggatagcgt gaccagaca     1080
gagggccagg tgaccgtctc cgaatctaag agtctgatca ttaactgtac ctactccgcc     1140
acatctatcg ggtatcctaa tctgttctgg tacgtgcgct atccaggcga ggggtgcag     1200
ctgctgtgta aagtcattac cgctgggcag aaggatcct ctcgaggatt cgaggcaaca     1260
    
```

ES 2 718 474 T3

tacaacaaag aagccacttc atttcatctg cagaaggcaa gcgtgcagga atcagatagc 1320
 gccgtgtact attgcgcact gtggtccggc tcttggcagc tgatctttgg atccggcacc 1380
 cagctgacag tgatgcccga cattcagaac cccgagcctg ccgtctatca gctgaaggac 1440
 cctcgaagtc aggatagcac cctgtgcctg ttcaccgact ttgattccca gatcaatgtg 1500
 cccaaaacaa tggaatctgg cactttcatt accgacaaga cagtcctgga tatgaaagct 1560
 atggacagta agtcaaacgg ggcaatcgcc tggagcaatc agacttcctt cacctgccag 1620
 gatatcttca aggagacaaa cgcaacttac cccagttcag acgtgccttg tgatgccact 1680
 ctgaccgaga agagcttcga aaccgacatg aacctgaatt ttcagaatct gagcgtgatg 1740
 ggctgcgca tctctgctgt gaaggtggct gggttcaatc tgctgatgac actgagactg 1800
 tggagtagtt gataa 1815

<210> 19
 <211> 822
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 19

atgacactaa agatggactc ttctccaggc ttcgtggctg tgatacttct catactggga 60
 aggacccatg gagattccgt gactcaaaca gaaggccaag tgactgtctc agaaagcaag 120
 tccctgataa taaattgcac gtattcagcc acaagcatag gttaccctaa tcttttctgg 180
 tatgttcgat atcctggaga aggtctacaa ctctcctga aagtcattac ggctggccag 240
 aaggaagca gcagagggtt tgaagccaca tacaataaag aagccacctc cttccacttg 300
 cagaaagcct cagtgcgaaga gtcagactcg gctgtgtact actgcgctct gtggtctggc 360
 agctggcaac tcatctttgg atctggaacc caactgacag ttatgcctga catccagaac 420
 ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat cctcgggtctc aggacagcac cctctgcctg 480
 ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcac 540
 actgacaaaa ctgtgctgga catgaaagct atggattcca agagcaatgg ggccattgcc 600
 tggagcaacc agacaagctt cacctgcaa gatatcttca aagagaccaa cgccacttac 660
 cccagttcag acgttcctctg tgatgccacg ttgactgaga aaagctttga aacagatatg 720
 aacctaaact ttcaaacct gtcagttatg ggactccgaa tctcctgct gaaagtagcc 780
 ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg tgggtccagtt ga 822

10

<210> 20
 <211> 912
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 20

ES 2 718 474 T3

atggctacaa ggctcctctg ttacacagta ctttgtctcc tgggtgcaag aatthtgaat 60
 tcaaaagtca ttcagactcc aagatatctg gtgaaagggc aaggacaaaa agcaaagatg 120
 aggtgtatcc ctgaaaagg acatccagtt gtattctggt atcaacaaaa taagaacaat 180
 gagtttaaat ttttgattaa ctttcagaat caagaagttc ttcagcaaat agacatgact 240
 gaaaaacgat tctctgctga gtgtccttca aactcacctt gcagcctaga aattcagtcc 300
 tctgagggcag gagactcagc actgtacctc tgtgccagca gggacagtcc tgaacagtac 360
 ttcgggtcccg gcaccaggct cacggtttta gaggatctga gaaatgtgac tccacccaag 420
 gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag attgcaaaca aacaaaaggc tacctctggtg 480
 tgcttgccca ggggcttctt ccctgaccac gtggagctga gctgggtgggt gaatggcaag 540
 gaggtccaca gtggggtcag cacggaccct caggcctaca aggagagcaa ttatagctac 600
 tgcctgagca gcgcctgag ggtctctgct accttctggc acaatcctcg aaaccacttc 660
 cgctgccaaag tgcagttcca tgggctttca gaggaggaca agtggccaga gggctcacc 720
 aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag gcctggggcc gagcagactg tggaatcact 780
 tcagcatcct atcatcaggg ggttctgtct gcaaccatcc tctatgagat cctactgggg 840
 aaggccacc tatatgctgt gctggtcagt ggctgggtgc tgatggccat ggtcaagaaa 900
 aaaaattcct ga 912

5

<210> 21
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Sintética

<400> 21

atgacactga aaatggactc aagccctgga ttcgtggctg tcatcctgct gattctgggc 60
 cggactcacg gggatagcgt gaccagaca gagggccagg tgaccgtctc cgaatctaag 120
 agtctgatca ttaactgtac ctactccgcc acatctatcg ggtatcctaa tctgttctgg 180
 tacgtgcgct atccaggcga ggggctgcag ctgctgctga aagtcattac cgctgggcag 240
 aagggatcct ctcgaggatt cgaggcaaca tacaacaaag aagccacttc atttcatctg 300
 cagaaggcaa gcgtgcagga atcagatagc gccgtgtact attgcgcaact gtggtccggc 360
 tcttggcagc tgatctttgg atccggcacc cagctgacag tgatgccc 408

15

<210> 22
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Sintética

<400> 22

ES 2 718 474 T3

atggccacac gcctgctgtg ctacactgtg ctgtgcctgc tgggggctcg catcctgaac 60
 tcaaaagtca tccagacacc tcgctacctg gtcaaaggcc aggggcagaa agccaagatg 120
 agatgcatcc ctgagaaggg gcacccagtg gtcttctggt accagcagaa caaaaacaat 180
 gagtccaagt ttctgatcaa ctttcagaat caggaagtgc tgcagcagat tgatgatgacc 240
 gagaagcggg tctcagccga atgccaagc aattccccct gtagcctgga gatccagagc 300
 tccgaagccg gcgatagcgc cctgtacctg tgcgctagca gagactcccc agagcagtat 360
 tttggaccgg gcacaagact gactgtgctg gaa 393

5 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 23

Ser Leu Ala Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

15 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 24

Ser Leu Leu Ala Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

25 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintética

<400> 25

Ser Leu Leu Met Ala Ile Thr Gln Cys
 1 5

35 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintética

<400> 26

Ser Leu Leu Met Trp Ala Thr Gln Cys
 1 5

ES 2 718 474 T3

5 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética
10 <400> 27

Ser Leu Leu Met Trp Ile Ala Gln Cys
1 5

15 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética
20 <400> 28

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Ala Cys
1 5

25

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, y que tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1), preferiblemente en donde el TCR:
- (a) tiene especificidad antigénica para NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (SEQ ID NO: 2);
 (b) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 10; y/o
 (c) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12.
2. Un polipéptido aislado o purificado que comprende una porción funcional del TCR según la reivindicación 1, en donde la porción funcional se une específicamente a NY-ESO-1 y comprende la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, preferiblemente en donde la porción comprende la secuencia de aminoácidos de:
- (a) SEQ ID NO: 9 o 10, o ambos SEQ ID NO: 9 y 10; o
 (b) SEQ ID NO: 11 o 12, o ambos SEQ ID NO: 11 y 12.
3. Una proteína aislada o purificada que se une específicamente a NY-ESO-1 y comprende todas las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-8 según la reivindicación 2, preferiblemente en donde la proteína comprende:
- (a) una primera cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-5 y una segunda cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-8;
 (b) una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o
 (c) una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.
4. Una proteína de fusión que comprende la proteína aislada o purificada según la reivindicación 3.
5. Un anticuerpo recombinante que comprende la proteína aislada o purificada según la reivindicación 3 o 4.
6. Un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el TCR según la reivindicación 1, el polipéptido según la reivindicación 2, o la proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, preferiblemente en donde la secuencia de nucleótidos
- (a) tiene codones optimizados, y/o
(b) comprende SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, amnos SEQ ID NO: 15 y 16,
o ambos SEQ ID NO: 19 y 20.
7. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 6.
8. El vector de expresión recombinante según la reivindicación 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 se encuentra 5' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, preferiblemente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 17.
9. El vector de expresión recombinante según la reivindicación 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena alfa de SEQ ID NO: 5 se encuentra 3' con respecto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR1 de la cadena beta de SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la cadena beta de SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de la cadena beta de SEQ ID NO: 8, preferiblemente en donde el vector de expresión recombinante comprende SEQ ID NO: 18.

10. Una célula anfitriona aislada que comprende el vector de expresión recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, preferiblemente en donde la célula es humana.

11. Una población de células que comprende al menos una célula anfitriona según la reivindicación 10.

12. Una composición farmacéutica que comprende el TCR según la reivindicación 1, el polipéptido según la reivindicación 2, la proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, el ácido nucleico según la reivindicación 6, el vector de expresión recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, la célula anfitriona según la reivindicación 10, o la población de células según la reivindicación 11, y un portador farmacéuticamente aceptable.

13. Un método *in vitro* para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con el TCR según la reivindicación 1, el polipéptido según la reivindicación 2, la proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, el ácido nucleico según la reivindicación 6, el vector de expresión recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, la célula anfitriona según la reivindicación 10, la población de células según la reivindicación 11, o la composición farmacéutica según la reivindicación 12, formando así un complejo, y

(b) detectar el complejo, en donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero,

preferiblemente, en donde el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de ovario o sarcoma de células sinoviales.

14. El TCR según la reivindicación 1, el polipéptido según la reivindicación 2, la proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, el ácido nucleico de la reivindicación 6, el vector de expresión recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, la célula anfitriona según la reivindicación 10, la población de células según la reivindicación 11, o la composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero, preferiblemente en donde el cáncer es melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de ovario o sarcoma de células sinoviales.

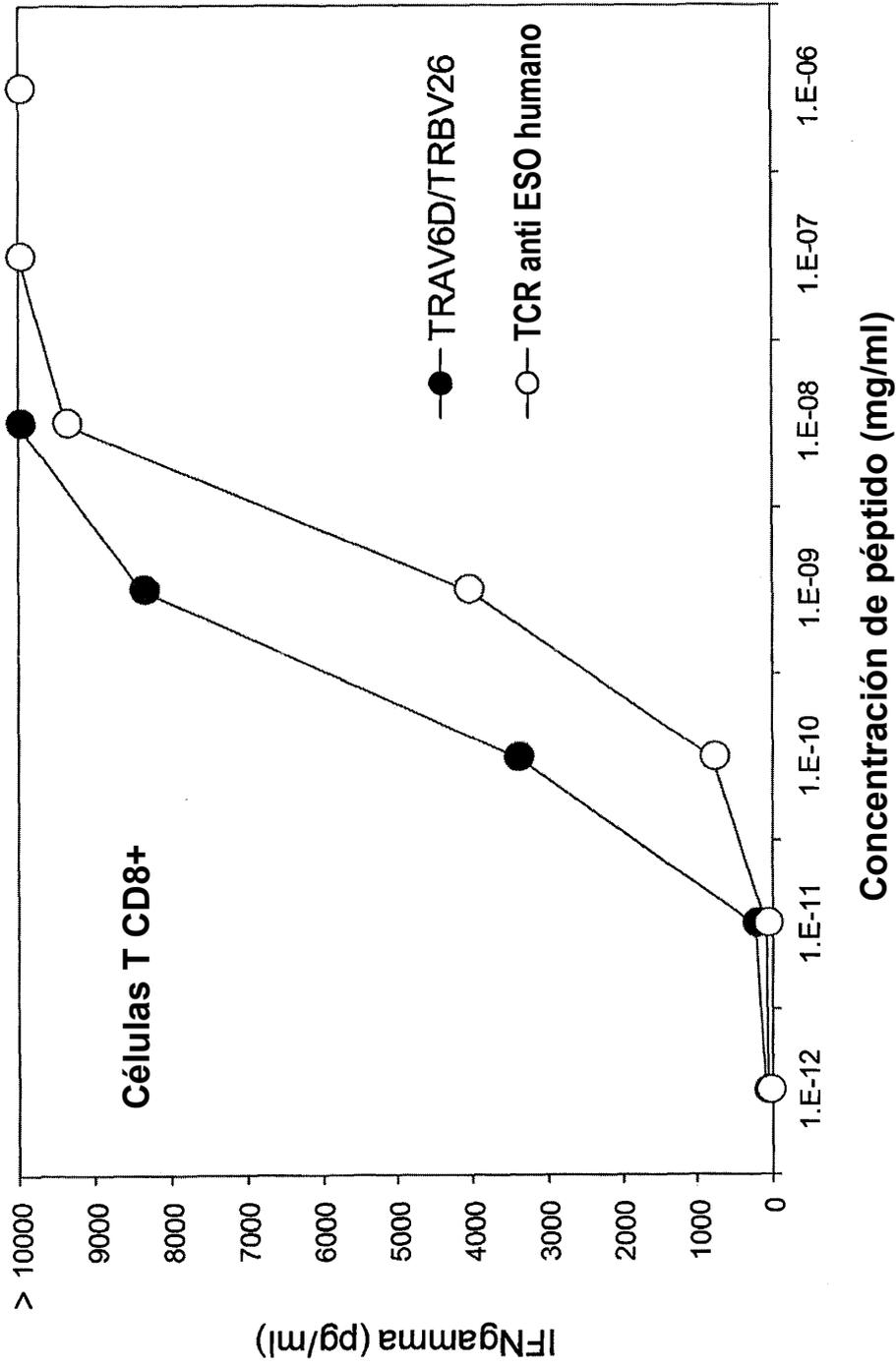


Fig. 1A

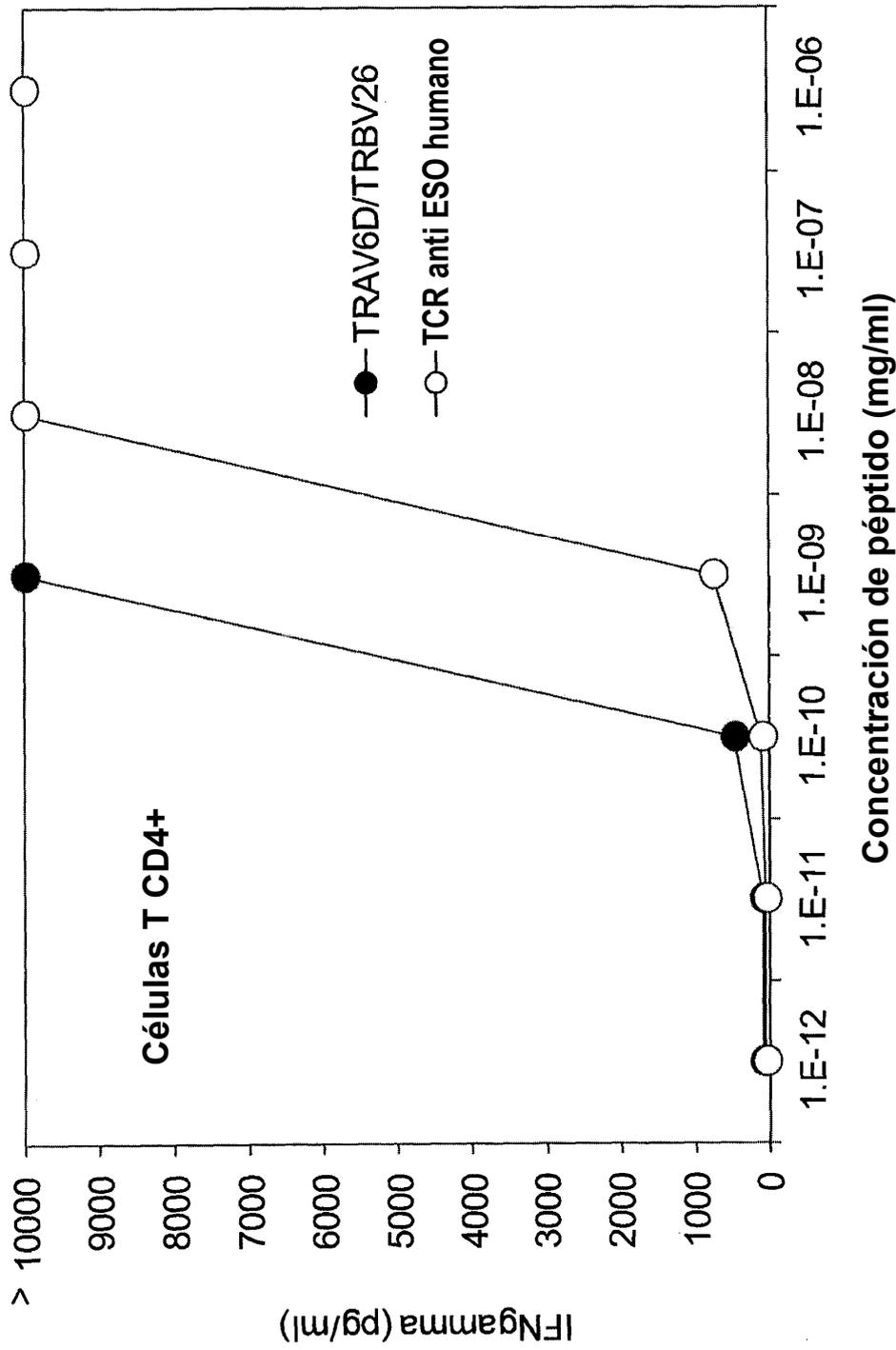


Fig. 1B

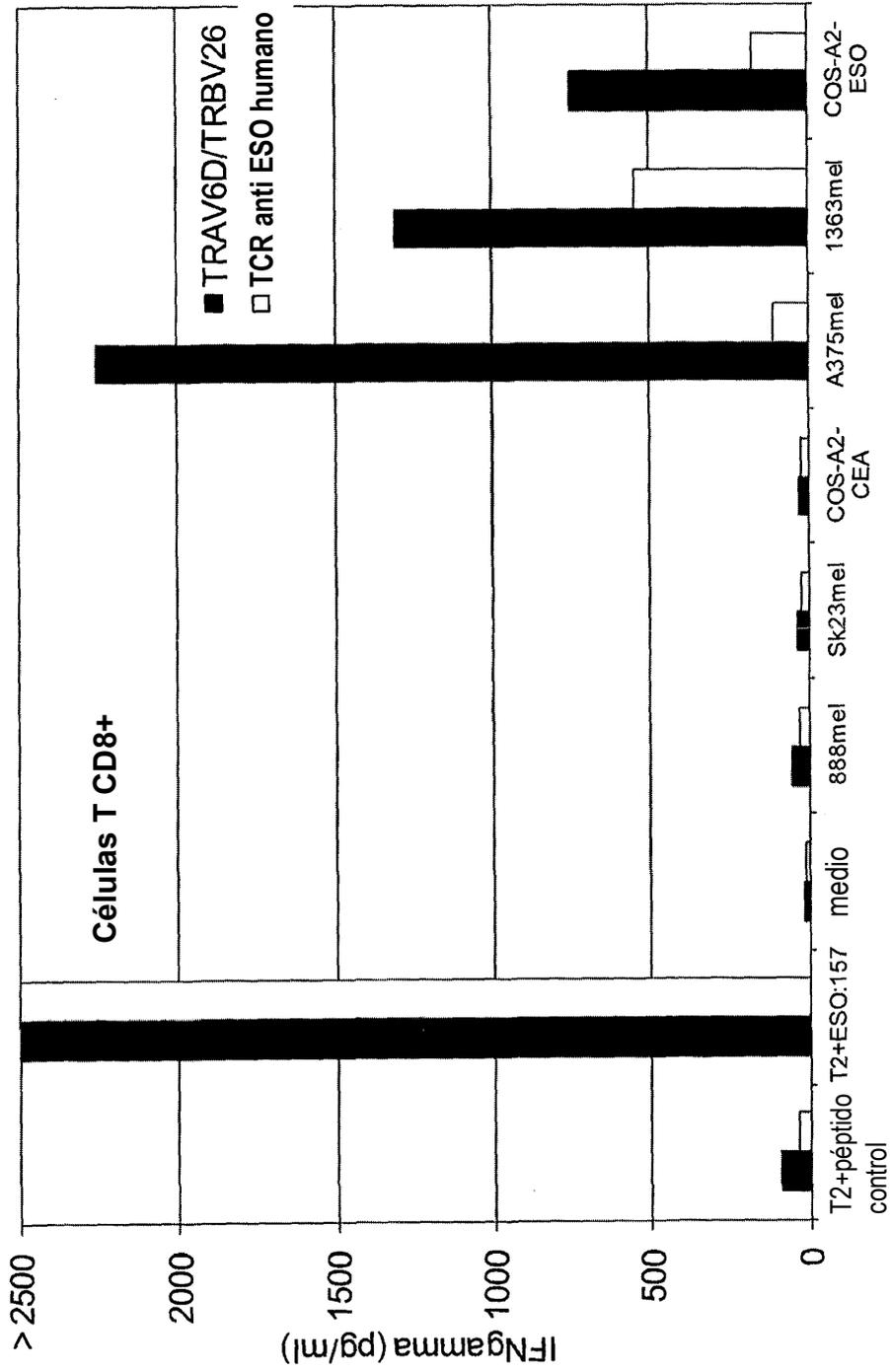


Fig. 2A

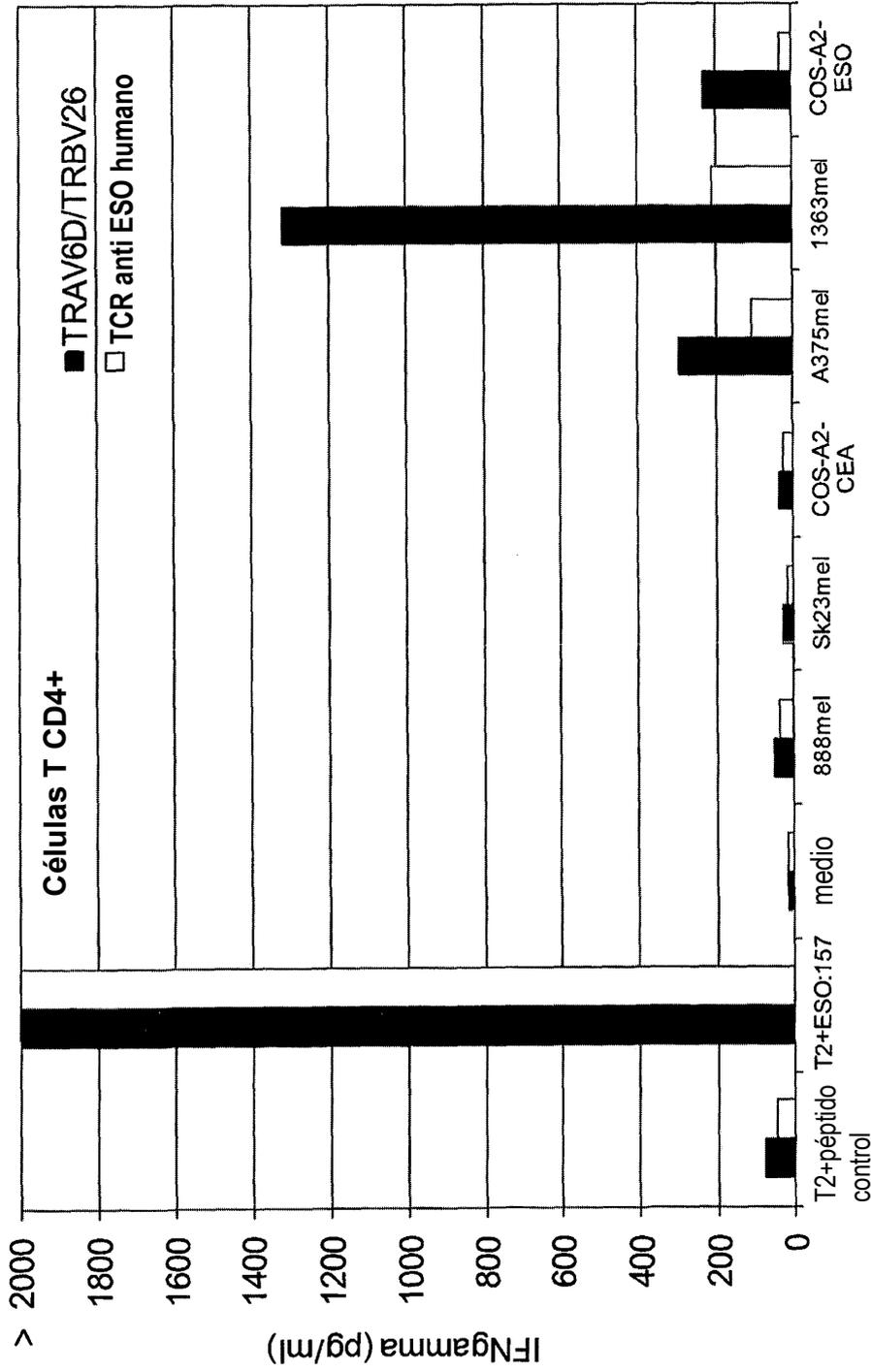


Fig. 2B