

I32956GB

LINFOCITOS T TRANSFECTADOS Y RECEPTORES DE LINFOCITO T PARA EL USO EN LA INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER

ANTECEDENTES

La inmunoterapia basada en los linfocitos T tiene como diana los epítomos peptídicos derivados de proteínas específicas o asociadas con los tumores, que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos asociados a tumores (TAA, por sus siglas en inglés) pueden ser péptidos derivados de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que son expresadas y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, normalmente aparecen reguladas al alza en las células del tumor correspondiente.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

La IGF2BP3 pertenece a la familia de las proteínas de unión al ARNm del factor de crecimiento insulinoide-II, implicada en la localización, el recambio y el control traduccional del ARNm. La presencia de altas concentraciones del transcrito de IGF2BP3 en numerosos tejidos tumorales en comparación con tejidos de control indica que dicha proteína podría desempeñar una función en las células transformadas en proliferación. La expresión de la IGF2BP3 se ha descrito en cierto número de tipos de cáncer, como son el carcinoma de células renales claras (CCR), el melanoma maligno, el carcinoma epidermoide esofágico, el carcinoma de páncreas o los

tumores uroteliales. Así pues, los epítomos derivados de la IGF2BP3 podrían servir como dianas para tratamientos antitumorales dirigidos contra los cánceres que expresan la IGF2BP3.

Existen dos tipos de moléculas MHC: Las MHC de clase I y las MHC de clase II. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y la caracterización de los antígenos asociados a tumor y de los correspondientes receptores de linfocito T es importante para el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer como son vacunas y terapias celulares.

En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos después por linfocitos T portadores de receptores de linfocito T (TCR) específicos. Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T como, entre otras, las vacunas antitumorales y las terapias celulares.

Si bien ha habido avances en el desarrollo de fármacos dirigidos contra dianas moleculares como tratamiento contra el cáncer, en este campo sigue existiendo la necesidad de nuevos agentes antitumorales que tengan como diana moléculas altamente específicas de las células cancerosas. La presente descripción aborda esa necesidad dando a conocer nuevos TCR, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras que se unen específicamente a epítomos de la IGF2BP3 como el péptido KIQEILTQV (IGF2BP3-001; SEQ ID N.º 1) y a variantes del mismo, así como métodos para usar tales moléculas en el tratamiento contra el cáncer.

RESUMEN

La presente descripción se refiere a receptores de linfocito T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta («TCR alfa/beta»). En otra forma de realización,

la presente descripción se refiere a TCR que comprenden una cadena gamma y una cadena delta («TCR gamma/delta»).

La presente descripción se refiere, además, a TCR, a subunidades individuales de TCR (solas o combinadas), y a subdominios de las mismas, a TCR solubles (sTCR), por ejemplo, TCR diméricos alfa/beta solubles provistos como mínimo de un enlace disulfuro intercatenario entre residuos del dominio constante que no están presentes en los TCR nativos, así como a TCR clonados, en que dichos TCR son obtenidos mediante técnicas de ingeniería genética en linfocitos T autólogos o alogénicos o en células progenitoras de linfocitos T, y métodos para fabricarlos, así como otras células provistas de dichos TCR.

La presente descripción se refiere, además, a un TCR que se une específicamente a un complejo formado por el péptido IGF2BP3-001 y una molécula de HLA (complejo de péptido IGF2BP3-001–molécula de HLA), en el que el péptido IGF2BP3-001 comprende, o consiste alternativamente en KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1). En una forma de realización la molécula de HLA es HLA-A*02.

La presente descripción se refiere, además, a un TCR que se une específicamente a un complejo formado por una molécula de HLA y un péptido IGF2BP3-001, en el que el péptido IGF2BP3-001 comprende, o consiste alternativamente en una variante del IGF2BP3-001 que es homóloga al menos en un 66%, preferentemente al menos en un 77%, y más preferentemente aún al menos en un 88% (es decir, idéntica preferentemente al menos en un 77% o al menos en un 88%) a la SEQ ID N.º 1, en que dicha variante se une a una molécula HLA de clase I o clase II y/o estimula a linfocitos T a que reaccionen de forma cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en que dicho péptido no es el polipéptido entero del que procede.

La presente descripción se refiere, además, a un péptido de la presente descripción que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 o una variante de la misma, que es homóloga al menos en un 66%, preferentemente al menos en un 77%, y más preferentemente aún al menos en un 88% (es decir, idéntica preferentemente al menos en un 77% o al menos en un 88%) a la

SEQ ID N.º 1, en que dicho péptido o variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferentemente de entre 8 y 30, y más preferentemente aún de entre 8 y 14 aminoácidos.

La presente descripción se refiere, además, a varios TCR que comprenden un dominio variable de la cadena alfa del TCR que presenta una secuencia idéntica al menos en el 75%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99%, pero preferentemente idéntica en el 90%, a la de un dominio variable de cadena alfa del TCR mostrado en la Tabla 1; y el dominio variable de cadena beta del TCR tiene una secuencia idéntica al menos en el 75%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99%, pero preferentemente idéntica en el 90% a la de un dominio variable de la cadena beta del TCR mostrado en la Tabla 1.

En una forma de realización, el dominio variable de cadena alfa del TCR presenta al menos una mutación con respecto al dominio de cadena alfa del TCR mostrado en la Tabla 1; y/o el dominio variable de cadena beta del TCR tiene como mínimo una mutación con respecto al dominio de cadena alfa del TCR mostrado en la Tabla 1. En una forma de realización, un TCR que comprende al menos una mutación en el dominio variable de cadena alfa del TCR y/o del dominio variable de cadena beta del TCR posee una afinidad de unión y/o una semivida de unión con un complejo formado por el péptido IGF2BP3-001 con una molécula HLA, que como mínimo duplica la del TCR que comprende un dominio variable de cadena alfa no mutado o un dominio variable de cadena beta no mutado.

Las cadenas alfa de TCR de la presente descripción pueden comprender, además, un dominio constante de cadena alfa de TCR cuya secuencia sea al menos idéntica en un 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a la del dominio constante de cadena alfa del TCR mostrado en la Tabla 1. Las cadenas beta de TCR de la presente descripción pueden comprender, además, un dominio constante de cadena beta del TCR cuya secuencia sea al menos idéntica en un 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% a la del dominio constante de cadena beta de TCR mostrado en la Tabla 1.

Las cadenas alfa de TCR de la presente descripción pueden comprender, además, un dominio transmembrana de cadena alfa y/o un dominio intracelular de cadena alfa. Las cadenas beta de TCR de la presente descripción pueden comprender, ade-

más, un dominio transmembrana de cadena beta y/o un dominio intracelular de cadena beta.

La descripción se refiere, además, a cadenas alfa de TCR que comprenden una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena alfa que se dan a conocer en la Tabla 1, así como a variantes de las mismas provistas de una, dos, tres o cuatro sustituciones con respecto a las CDR mostradas en la Tabla 1. Además, se describen cadenas alfa de TCR que comprenden al menos una CDR seleccionada entre las CDR1, CDR2 y CDR3 mostradas en la Tabla 1. Además, se describen cadenas alfa de TCR que comprenden al menos la CDR3 de cadena alfa mostrada en la Tabla 1.

La descripción se refiere, además, a cadenas beta de TCR que comprenden una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena beta que se dan a conocer en la Tabla 1, así como a variantes de las mismas provistas de una, dos, tres o cuatro sustituciones con respecto a las CDR mostradas en la Tabla 1. Además, se describen cadenas beta de TCR que comprenden al menos una CDR seleccionada entre las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena beta mostradas en la Tabla 1. Además, se describen cadenas beta de TCR que comprenden al menos la CDR3 de cadena beta mostrada en la Tabla 1.

La descripción se refiere, además, a un ácido nucleico aislado o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un TCR de la presente descripción. En una forma de realización, los ácidos nucleicos de la descripción codifican una cadena alfa de TCR y/o una cadena beta de TCR como las mostradas en la Tabla 1.

La descripción se refiere, además, a un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena alfa de TCR, una cadena beta de TCR, o ambas, tal y como se describe en la presente memoria.

La descripción se refiere, además, a una célula hospedadora aislada que comprende un vector de expresión recombinante que expresa un ácido nucleico que codifica la

cadena alfa de TCR, la cadena beta de TCR, o ambas, tal y como se describe en la presente memoria.

La descripción se refiere, además, a una célula hospedadora aislada que comprende un vector de expresión recombinante conforme con la presente descripción, preferentemente en el que la célula es una célula humana, preferentemente un linfocito de sangre periférica (LSF), y más preferentemente un linfocito T CD4-positivo o CD8-positivo.

La descripción se refiere, además, a un linfocito de sangre periférica (LSF) aislado que comprende el vector de expresión recombinante de la descripción, en que el LSF es un linfocito T CD8+ o CD4+.

La descripción se refiere, además, a una población de células que comprende al menos una célula hospedadora descrita en la presente memoria.

La descripción se refiere, además, a TCR y a células hospedadoras de la presente descripción para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, como cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro (glioblastoma, neuroblastoma, etc.), cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago.

En un aspecto, la célula hospedadora es un linfocito T CD8+ o un linfocito T CD4+ transfectado con un ácido nucleico que codifica al menos un TCR acorde con la descripción, en que el TCR comprende al menos una secuencia de aminoácidos dada a conocer en la Tabla 1. En otro aspecto, tales células hospedadoras se usan en la inmunoterapia contra el cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro (glioblastoma, neuroblastoma, etc.), cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama,

carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago.

La descripción se refiere, además, a métodos para destruir o reducir el número de células cancerosas, los cuales comprenden poner en contacto las células cancerosas con un TCR, ácido nucleico, vector o célula hospedadora como los descritos en la presente memoria. También se proveen métodos para el tratamiento del cáncer que comprenden la administración a un sujeto que lo necesita de un TCR, ácido nucleico, vector o célula hospedadora como los descritos en la presente memoria.

La descripción se refiere, además, a un ácido nucleico que codifica un TCR acorde con la descripción, y a un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico acorde con la descripción.

La presente descripción se refiere, además, a un TCR acorde con la descripción, un ácido nucleico acorde con la descripción o un vector de expresión acorde con la descripción para el uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer.

La descripción se refiere, además, a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico acorde con la descripción o un vector de expresión tal y como se ha descrito antes.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora acorde con la descripción que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente es una célula dendrítica.

La descripción se refiere, además, a un método para producir un péptido acorde con la descripción, en el que el método comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la descripción y el aislamiento del péptido de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La descripción se refiere, además, a métodos acordes con la descripción, en los que el antígeno se carga en moléculas MHC de clase I o II que se expresan en la super-

ficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o en una célula presentadora de antígeno artificial mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con una célula presentadora de antígeno, o bien el antígeno se carga en tetrameros MHC de clase I o II mediante la tetramerización de monómeros del complejo MHC de clase I o II/antígeno.

La descripción se refiere, además, al método acorde con la descripción, en el que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar o que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 1 o una variante de la misma.

La descripción se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la descripción, en que el linfocito T reconoce selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos acorde con la descripción.

La descripción se refiere, además, a métodos para destruir y/o suprimir células cancerosas en un paciente cuyas células cancerosas expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos acorde con la descripción, comprendiendo los métodos la administración al paciente de un número efectivo de linfocitos T producidos conforme a la descripción.

La descripción se refiere, además, al uso de cualquier péptido descrito en la presente memoria, ácidos nucleicos conformes con los descritos en la presente memoria, vectores de expresión descritos en la misma, células descritas en la misma, linfocitos T activados descritos en la misma, además de receptores de linfocito T, anticuerpos, u otras moléculas de unión a péptido y/o a complejos de péptido-MHC acordes con la presente descripción como medicamento o en la fabricación de un medicamento. En un aspecto, el medicamento es activo contra el cáncer.

Preferiblemente, dicho medicamento es una terapia celular, un TCR, un TCR soluble o un anticuerpo.

La presente descripción se refiere, además, a un uso acorde con la presente descripción, en el que las células cancerosas son células de cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro (glioblastoma, neuroblastoma, etc.), cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago, pero preferiblemente cáncer de pulmón amicrocítico.

La presente descripción se refiere, además, a biomarcadores basados en los péptidos acordes con la presente descripción, aquí denominados «dianas», que pueden servir para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del cáncer de pulmón amicrocítico. El marcador puede ser la sobrerepresentación del péptido o los péptidos en cuestión, o la sobreexpresión del gen o los genes correspondientes. Los marcadores también podrían servir para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferiblemente una inmunoterapia, y más preferiblemente de una inmunoterapia dirigida contra la misma diana que es identificada con el biomarcador. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo o un TCR soluble para teñir cortes histológicos del tumor con el fin de detectar la presencia de un péptido de interés unido en complejo con un MHC. Opcionalmente el anticuerpo o el TCR soluble pueden estar dotados de otra función efectora, como es un dominio inmunoestimulante o una toxina.

La presente descripción se refiere, además, al uso de esas novedosas dianas para la identificación de TCR que reconozcan al menos una de dichas dianas, y preferentemente la identificación entre esos TCR de los que activen a los linfocitos T.

La presente descripción también se refiere al uso de estas nuevas dianas en el contexto del tratamiento del cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 muestra la presentación del péptido IGF2BP3-001 en tejidos sanos y cancerosos.

Las figuras 2 a 4 muestran la expresión del IGF2BP3-001 en tejidos cancerosos y sanos.

La Fig. 5 muestra la tinción con tetrámeros de MHC/IGF2BP3-001 o con tetrámeros de MHC/NYESO1-001 de linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R10P1A7 (Tabla 1). A modo de controles se usaron linfocitos T CD8+ transformados con ARN del TCR 1G4 que se une específicamente al complejo MHC/NYESO1-001 y sometidos a una transformación ficticia.

La Fig. 6 muestra la liberación de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R10P1A7 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con células diana cargadas con el péptido IGF2BP3-001 (SEQ ID N.º 1) o con células cargadas con el péptido homólogo pero no relacionado CLUA-001 (SEQ ID N.º 26), CHCHD6-001 (SEQ ID N.º 27), CDC42BPG-001 (SEQ ID N.º 28), PARP14-002 (SEQ ID N.º 29), SYNE2-001 (SEQ ID N.º 30), IFT7-001 (SEQ ID N.º 31), DHRS12-001 (SEQ ID N.º 32), STX12-001 (SEQ ID N.º 33), EEA-001 (SEQ ID N.º 34), SENP7-001 (SEQ ID N.º 35), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 36). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron con linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación para absorber ARN, solos o incubados conjuntamente con células diana no cargadas.

La Fig. 7 muestra la liberación de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R10P1A7 tras su incubación conjunta con células diana cargadas con el péptido IGF2BP3-001 (SEQ ID N.º 1) o con diversas variantes de la SEQ ID N.º 1 del IGF2BP3-001 con sustitución de alanina en las posiciones 1 a 9. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para absorber ARN, solos o incubados conjuntamente con células diana cargadas con el péptido de control NYESO1-001 o bien células diana no cargadas. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron con linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes distintos.

La Fig. 8 muestra la liberación de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para absorber el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R10P1A7 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con la estirpe de células de melanoma A-375, la estirpe de células de glioblastoma T98G y la estirpe celular de cáncer de mama SK-BR-3, en ese orden. Como control se utilizaron linfocitos T CD8+ solos que habían sido sometidos a electroporación con ARN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se refiere a receptores de linfocito T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta («TCR alfa/beta»). Asimismo proporciona péptidos IGF2BP3-001 capaces de unirse a TCR y a anticuerpos cuando son presentados por una molécula del MHC. La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para expresar los TCR y los péptidos de la presente descripción, así como métodos para el uso de los mismos.

DEFINICIONES

En la presente memoria todos los términos corresponden a la definición indicada a continuación, salvo en los casos en que se indique otra cosa.

El término «receptor de linfocito T» (abreviado TCR) se refiere a una molécula heterodimérica que comprende una cadena polipeptídica alfa (cadena alfa) y una cadena polipeptídica beta (cadena beta), en que el receptor heterodimérico es capaz de unirse a un antígeno peptídico presentado por una molécula HLA.

El término «respuesta de linfocitos T» define la proliferación y la activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. En el caso de los linfocitos T citotóxicos restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden consistir en la lisis de células diana presentadoras naturales de péptido o bien sensibilizadas de manera repetida con un péptido o con un precursor del mismo; la secreción de citocinas inducida por el péptido, preferentemente de interferón gamma, TNF-alfa o IL-2; la secreción de moléculas efectoras inducida por el péptido, preferentemente granzimas o perforinas; o la desgranulación.

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12 o más aminoácidos, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la descripción) pueden tener hasta 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aminoácidos de longitud.

Además, el término «péptido» incluye sales de una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como por ejemplo, sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Se ha de destacar que las sales de los péptidos conformes a la presente descripción difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en tales condiciones *in vivo*.

El término «péptido» incluye también «oligopéptido». El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial para la descripción, siempre que se mantengan el epítipo o epítipos correctos. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 15, aproximadamente.

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial para la descripción, siempre que se mantengan los epítipos correctos. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifique dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un «inmunógeno» en la presente descripción), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente descripción, la

inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente descripción, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con MHC, el oligopéptido y/o la proteína que se utiliza para generar anticuerpos o TCR específicos contra él.

Un «epítipo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que pueda ser reconocido por un linfocito T provisto de un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

La secuencia nucleotídica que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser natural o estar construida de forma sintética. Generalmente los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas se ensamblan con fragmentos de ADNc y oligonucleótidos cortos de enlace, o con una serie de oligonucleótidos, que dan como resultado un gen sintético capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores procedentes de un operón microbiano o vírico.

Tal y como se utiliza en la presente memoria el término «un nucleótido que codifica un péptido» se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido y que incluye codones artificiales (sintetizados por el hombre) de inicio y terminación compatibles con el sistema biológico en el que la secuencia va a ser expresada, por ejemplo, con una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

Tal y como se utiliza en la presente memoria el término «un nucleótido que codifica un péptido» se refiere a una o más secuencias de nucleótidos que codifican el TCR y que incluyen codones artificiales (sintetizados por el hombre) de inicio y termina-

ción compatibles con el sistema biológico en el que la secuencia va a ser expresada, por ejemplo, con un linfocito T u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye tanto el ácido nucleico monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, en lo que concierne por ejemplo al ADN, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia.

El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

La región codificante puede derivar de un gen no mutado («normal»), mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

El término «producto de expresión» define el polipéptido o la proteína que es el producto natural de la traducción del gen y de cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifique los equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y, por tanto, que codifique el mismo aminoácido o aminoácidos.

El término «fragmento», cuando se refiere a una secuencia de codificación, define una porción de ADN que no comprende la región codificante entera, cuyo producto de expresión conserva esencialmente la misma actividad o función biológica que el producto de expresión de la región codificante entera.

El término «segmento de ADN» hace referencia a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como componente de un constructo de ADN mayor, que deriva de ADN aislado por lo menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, exento de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concen-

tración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias nucleotídicas constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes corriente abajo (*downstream*) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

El término «cebador» define una secuencia corta de ácidos nucleicos que puede aparearse con una cadena de ADN y que proporciona un extremo 3'-OH libre en el que una polimerasa de ADN puede comenzar la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

El término «promotor» define una región de ADN implicada en la unión de la polimerasa de ARN para iniciar la transcripción.

El término «aislado» define el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero ese mismo polinucleótido o polipéptido lo estará si es separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. En un aspecto, tales polinucleótidos podrán formar parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrán formar parte de una composición, y seguir estando aislados en dicho vector o composición puesto que estos no forman parte de su entorno natural.

Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunogénicos, descritos de acuerdo con la presente descripción también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan sólo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de inicio

o del material natural hasta, al menos, un orden de magnitud; preferiblemente, dos o tres órdenes de magnitud; y, con mayor preferencia, cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

Los ácidos nucleicos y los productos de expresión polipeptídicos dados a conocer conformes a la presente descripción, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% en peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente descripción pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada. El término «fragmento activo» define un fragmento, normalmente un péptido, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra –solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado o en un vector– a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación con los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Utilizados en relación

con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

Conforme a la presente descripción, el término «identidad porcentual» o «porcentaje de identidad», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:

$$\text{Identidad porcentual} = 100 [1 - (C/R)]$$

donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, donde

- (I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
 - (II) cada hueco (*gap*) de la secuencia de referencia y
 - (III) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y
 - (IV) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;
- y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que la identidad porcentual, calculada como se ha especificado arriba, es aproximadamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima especificada, entonces la secuencia comparada guarda la identidad porcentual mínima especificada con la secuencia de referencia, aunque puedan existir alineaciones en las que la identidad porcentual calculada arriba resulte menor que la identidad porcentual especificada.

En la descripción el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos,

es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas.

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido.

Por «variante» de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID N.º 1. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de los linfocitos T activados. De modo similar, un TCR se puede modificar para que mejore, o al menos mantenga, la capacidad para interaccionar y unirse a un complejo formado por una molécula MHC adecuada/KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1), como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore, o al menos mantenga, la capacidad para activar linfocitos T.

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar aquellas que expresen un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín, como la KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1), tal y como se define en los aspectos de la descripción. Como se puede deducir de la bibliografía (Rammensee *et al.*, 1999) y de las bases de datos científicas, ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que cons-

tituyen la hendidura de unión. En otro aspecto, una persona versada en la materia que siga las enseñanzas de la descripción puede modificar la secuencia de aminoácidos de un TCR, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y determinar si tales variantes del TCR conservan la capacidad de unirse a complejos formados por moléculas MHC de clase I o II con el KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1). Las variantes de TCR de la descripción conservan la capacidad de unirse a complejos de moléculas MHC de clase I o II con el KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1). Los linfocitos T que expresen las variantes de TCR de la descripción podrán destruir subsiguientemente las células que expresen un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín, como el KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1).

En un aspecto, los péptidos o TCR dados a conocer en la presente memoria se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en diferentes sitios de la cadena peptídica, posiblemente selectivos, si no se especifica de otra manera. Preferentemente tales sustituciones estarían situadas al final de la cadena de aminoácidos de dicho péptido. En los TCR, preferentemente tales sustituciones están localizadas en los dominios variables de la cadena alfa y de la cadena beta del TCR. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, cuando un aminoácido es reemplazado por otro aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrofóbico que es sustituido por otro aminoácido hidrofóbico. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos de tamaño y naturaleza química igual o similar como, por ejemplo, el reemplazo de una leucina por una isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las «sustituciones conservadoras».

Las sustituciones conservadoras se definen como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados

positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro con características similares, pero diferenciado de alguna manera en el tamaño, como en el reemplazo de un residuo de alanina por uno de isoleucina. Los reemplazos muy poco o nada conservadores pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por otro polar, o incluso por uno de carácter básico. Estas sustituciones «radicales» no se pueden descartar, sin embargo, como potencialmente inefectivas, ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales bien pueden provocar efectos inesperados imposibles de predecir de otra forma a partir de principios químicos simples.

En un aspecto, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la descripción y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, se pueden usar también otros aminoácidos no convencionales (distintos de los aminoácidos naturales que constituyen las proteínas) con fines de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos acordes con la presente descripción.

Si se descubre que las sustituciones en más de una posición dan lugar a un péptido con actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor, como se define más abajo, entonces las combinaciones de dichas sustituciones se probarán para determinar si las sustituciones combinadas provocan efectos aditivos o sinérgicos en la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán hasta 4 posiciones simultáneamente dentro del péptido.

RECEPTORES DE LINFOCITO T (TCR)

En una forma de realización preferida, la descripción se refiere a un TCR que comprende una cadena alfa de TCR mostrada en la Tabla 1, y a variantes de la misma, así como una cadena beta de TCR mostrada en la Tabla 1, y variantes de la misma. En un aspecto, un TCR descrito en la presente memoria tiene la capacidad de unirse

o de unirse específicamente a un complejo formado por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I y el KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1) o bien a otro complejo formado por una molécula MHC de clase II y el KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1).

Tabla 1: TCR representativo acorde con la presente descripción

ID del TCR	Descripción	Secuencia
R10P1A7 Cadena alfa	Cadena alfa	MKTFAGFSFLFLWLQLD- CMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTY- LYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRL- TVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAESKETRL- MFGDGTQLVVKPNIQNPD- PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD- SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK- SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF- PSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIG- FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID N.º 2)
	Segmento L (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR (SEQ ID N.º 3)
	Cadena V (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLD- CMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTY- LYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRL- TVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAES (SEQ ID N.º 4)
	CDR1	DSSSTY (SEQ ID N.º 5)
	CDR2	IFS (SEQ ID N.º 6)
	CDR3	CAESKETRLMF (SEQ ID N.º 7)
	Segmento J (TRAJ31)	RLMFGDGTQLVVKP (SEQ ID N.º 8)
	Región constante (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD- SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK- SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF- PSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIG- FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID N.º 9)
R10P1A7 Cadena be- ta	Cadena beta	MLLLLLLLGPGISLLPGSLAGSGLGAV- VSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATT- MFWYRQFPKQSLMLMATSNEG- SKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFY- ICSARAGGHEQFFGPGTRLTVLEDLK- NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPH- VELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL- NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFY- GLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRK- DSRG (SEQ ID N.º 10)
	Segmento L (TRBV20-1)	MLLLLLLLGPGISLLPGSLAGSGL (SEQ ID N.º 11)

	Cadena V (TRBV20-1)	MLLLLLLLGPGISLLLPGLAGSGLGAV- VSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATT- MFWYRQFPKQSLMLMATSNEG- SKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFY- ICSAR (SEQ ID N.º 12)
	CDR1	DFQATT (SEQ ID N.º 13)
	CDR2	SNEGSKA (SEQ ID N.º 14)
	CDR3	CSARAGGHEQFF (SEQ ID N.º 15)
	Cadena J (TRBJ2-1)	EQFFGPGTRLTVL (SEQ ID N.º 16)
	Región constante (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSE- AEISHTQKATLVCLATGFYPDH- VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL- NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFY- GLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRK- DSRG (SEQ ID N.º 17)

Las cadenas alfa y beta de los TCR alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los TCR gamma/delta, se consideran en general dotadas de dos «dominios», esto es, dominios variable y constante. El dominio variable consiste en la concatenación de la región variable (V) con la región de unión (J). El dominio variable también puede incluir una región líder (L). Las cadenas beta y delta también pueden incluir una región de diversidad (D). Los dominios constantes alfa y beta también pueden incluir dominios transmembrana (TM) C-terminales que anclan las cadenas alfa y beta a la membrana celular.

En la presente descripción, el término «dominio variable de cadena alfa de TCR» se refiere por tanto a la concatenación de la región V alfa del TCR (TRAV) sin la región líder (L), con la región J alfa del TCR (TRAJ), y el término «dominio constante de cadena alfa de TCR» se refiere a la región TRAC extracelular, o a una secuencia TRAC truncada en su extremo C-terminal, y opcionalmente a un dominio transmembrana alfa (VIGFRILLLLKVAGFNLLMTL (SEQ ID N.º 18)).

De modo similar, el término «dominio variable de cadena beta de TCR» se refiere a la concatenación de la región V beta del TCR (TRBV) sin región líder (L) con la región D/J beta del TCR (TRBD/TRBJ), y el término «dominio constante de cadena beta de TCR» se refiere a la región extracelular TRBC, o a una secuencia TRBC trun-

cada en su extremo C-terminal, y opcionalmente a un dominio transmembrana beta (TILYEILLGKATLYAVLVSAVL (SEQ ID N.º 19)).

Con respecto a los TCR gamma/delta, el término «dominio variable de cadena gamma de TCR» tal y como se emplea en la presente memoria se refiere a la concatenación de la región V de la cadena gamma del TCR sin región líder (L) (TRGV) con la región J de la cadena gamma del TCR (TRGJ), y el término «dominio constante de cadena gamma de TCR» se refiere a la región extracelular TRGC, o a una secuencia TRGC truncada en su extremo C-terminal. De modo similar, el término «dominio variable de cadena delta de TCR» se refiere a la concatenación de la región V de la cadena delta del TCR (TRDV) sin la región líder (L) con la región D/J de la cadena delta del TCR (TRDD/TRDJ), y el término «dominio constante de cadena delta de TCR» se refiere a la región extracelular TRDC, o a una secuencia TRDC truncada en su extremo C-terminal.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende o consiste en una cadena alfa de TCR que es idéntica al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero idéntica preferentemente en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% a la cadena alfa de TCR mostrada en la Tabla 1. Las cadenas alfa de TCR mostradas en la Tabla 1 contienen un segmento líder (L), una cadena V, tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3), una región de unión (J) y una región constante, tal y como se definen en la Tabla 1.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende o consiste en un dominio variable de cadena alfa de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntico en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% a un dominio variable de cadena alfa de TCR mostrado en la Tabla 1.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende o consiste en un dominio constante de cadena alfa de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero

preferentemente idéntico en un 75% al dominio constante de cadena alfa de TCR mostrado en la Tabla 1.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena alfa seleccionado del grupo consistente en las CDR de cadena alfa CDR1, CDR2 y CDR3 mostradas en la Tabla 1. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende la CDR3 de cadena alfa mostrada en la Tabla 1. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende una de las CDR de cadena alfa CDR1, CDR2 y CDR3 mostradas en la Tabla 1.

En una forma de realización especialmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en un dominio variable de cadena alfa de TCR provisto de una secuencia idéntica al menos en un 90% a la del dominio variable de cadena alfa de TCR mostrado en la Tabla 1, y que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 del mismo dominio variable alfa de la citada Tabla.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, una cadena beta de TCR que es idéntica al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntica en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% a la cadena beta de TCR mostrada en la Tabla 1. Las cadenas beta del TCR mostradas en la Tabla 1 contienen un segmento líder (L), una cadena V, tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3), una región de unión (J) y una región constante, tal y como se definen en la Tabla 1.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en un dominio variable de cadena beta de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntico en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% al dominio variable de cadena beta de TCR mostrado en la Tabla 1.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en un dominio constante de cadena beta de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntico en un 75% al dominio constante de cadena beta de TCR mostrado en la Tabla 1.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena beta seleccionada del grupo consistente en las CDR de cadena beta CDR1, CDR2 y CDR3 mostradas en la Tabla 1. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende la CDR3 de cadena beta mostrada en la Tabla 1. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende una de las CDR de cadena beta CDR1, CDR2 y CDR3 mostradas en la Tabla 1.

En una forma de realización especialmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, un dominio variable de cadena beta de TCR provisto de una secuencia idéntica al menos en un 90% o un 95% a la del dominio variable de cadena beta de TCR de la Tabla 1, y que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 del mismo dominio variable de cadena beta de TCR de la Tabla 1.

El dominio variable de la cadena alfa puede comprender uno o más dominios CDR alfa provistos de una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de la CDR correspondiente mostrada en la Tabla 1. De modo similar, el dominio variable de la cadena beta puede comprender uno o más dominios CDR beta provistos de una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de la CDR beta correspondiente mostrada en la Tabla 1.

La cadena alfa y la cadena beta del TCR pueden estar fusionadas formando un TCR monocatenario. Otra alternativa es que las cadenas alfa y beta del TCR puedan expresarse como proteínas separadas cuyo ensamblaje dé lugar a un heterodímero.

En una forma de realización, cualquier cadena alfa de TCR de la Tabla 1 se empareja con cualquier otra cadena beta de TCR para producir un TCR que se une especí-

ficamente a un complejo formado por un péptido IGF2BP3-001 y una molécula HLA. En otra forma de realización, cualquier cadena beta de TCR de la Tabla 1 se empareja con cualquier otra cadena alfa de TCR para producir un TCR que se une específicamente a un complejo formado por un péptido IGF2BP3-001 y una molécula HLA.

TCR R10P1A7

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende, o consiste en, la cadena alfa y/o la cadena beta del TCR R10P1A7, correspondientes respectivamente a la SEQ ID N.º 2 y la SEQ ID N.º 10.

El dominio variable de cadena alfa de TCR correspondiente al TCR R10P1A7 comprende, o alternatively consiste en los aminoácidos 22 a 130 de la SEQ ID N.º 2; el dominio constante de cadena alfa del TCR correspondiente al TCR R10P1A7 comprende, o alternatively consiste en los aminoácidos 131 a 271 de la SEQ ID N.º 2; el dominio variable de cadena beta del TCR correspondiente al TCR R10P1A7 comprende, o alternatively consiste en los aminoácidos 26 a 139 de la SEQ ID N.º 10; y el dominio constante de cadena beta del TCR comprende, o alternatively consiste en los aminoácidos 140 a 318 de la SEQ ID N.º 10.

En una forma de realización concreta, un TCR de la presente descripción comprende una cadena alfa de TCR que es idéntica al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntica en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% a la cadena alfa de TCR de la SEQ ID N.º 2.

En otra forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntico en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% al dominio variable de cadena alfa de TCR de la SEQ ID N.º 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena alfa de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntico en un 75% al dominio constante de cadena alfa de TCR de la SEQ ID N.º 2.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena alfa seleccionada del grupo consistente en las CDR de cadena alfa CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º 2. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende la CDR3 de cadena alfa de la SEQ ID N.º 2. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena alfa de TCR comprende las CDR de cadena alfa CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º 2.

En una forma de realización especialmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena alfa de TCR provisto de una secuencia idéntica al menos en un 90% a la del dominio variable de cadena alfa de TCR de la SEQ ID N.º 2, y que comprende las CRD1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º 2.

En otra forma de realización concreta, un TCR de la presente descripción comprende una cadena beta de TCR que es idéntica al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntica en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% a la cadena beta de TCR de la SEQ ID N.º 10.

En otra forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente idéntico en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% al dominio variable de cadena beta de TCR de la SEQ ID N.º 10.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio constante de cadena beta de TCR que es idéntico al menos en un 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99%, pero preferentemente

idéntico en un 75% al dominio constante de cadena beta de TCR de la SEQ ID N.º 10.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena beta seleccionada del grupo consistente en las CDR de cadena beta CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º 10. En una forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende la CDR3 de cadena beta de la SEQ ID N.º 10. En otra forma de realización preferida, el dominio variable de cadena beta de TCR comprende las CDR de cadena beta CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º 10.

En una forma de realización especialmente preferida, un TCR de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena beta de TCR provisto de una secuencia idéntica al menos en un 90% a la del dominio variable de cadena beta de TCR de la SEQ ID N.º 10, y que comprende las CRD1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º 10.

El dominio variable de la cadena alfa puede comprender uno o más dominios CDR alfa provistos de una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de la CDR correspondiente de la SEQ ID N.º 2. De modo similar, el dominio variable de la cadena beta puede comprender uno o más dominios CDR beta provistos de una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de la CDR beta de la SEQ ID N.º 10.

En otra forma de realización aún más preferida, un TCR de la presente descripción se une específicamente a un complejo formado por un péptido de la IGF2BP3 con una molécula HLA, en el que el péptido IGF2BP3 es seleccionado entre el KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1) y las variantes del mismo. En una forma de realización, la molécula HLA es una molécula MHC de clase I seleccionada del grupo consistente en moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C. En una forma de realización, la molécula HLA es HLA-A*02. En otra forma de realización, la molécula HLA es una molécula MHC de clase II seleccionada del grupo consistente en moléculas HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR.

Los TCR de la presente descripción se unen preferentemente a un complejo formado por un péptido de IGF2BP3 y una molécula de HLA con una afinidad de unión (K_D) de aproximadamente 100 μ M o menos, aproximadamente 50 μ M o menos, aproximadamente 25 μ M o menos, o aproximadamente 10 μ M o menos. Se prefieren más los TCR con alta afinidad dotados de una afinidad de unión de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos. Algunos ejemplos sin ánimo de limitación de intervalos de afinidad de unión preferidos para los TCR de la presente invención son: aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM; aproximadamente 10 nM a aproximadamente 20 nM; aproximadamente 20 nM a aproximadamente 30 nM; aproximadamente 30 nM a aproximadamente 40 nM; aproximadamente 40 nM a aproximadamente 50 nM; aproximadamente 50 nM a aproximadamente 60 nM; aproximadamente 60 nM a aproximadamente 70 nM; aproximadamente 70 nM a aproximadamente 80 nM; aproximadamente 80 nM a aproximadamente 90 nM; y aproximadamente 90 nM a aproximadamente 100 nM.

Tal y como se usa en relación con los TCR de la presente descripción, «unión específica» y las variantes gramaticales de dicho término se emplean para designar un TCR dotado de una afinidad de unión (K_D) hacia un complejo formado por un péptido de IGF2BP3 y una molécula HLA igual o inferior a 100 μ M.

Los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden incorporar un enlace disulfuro introducido entre sus dominios constantes. Los TCR preferidos de este tipo incluyen aquellos dotados de una secuencia de dominio constante TRAC y de una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, con la salvedad de que la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 están sustituidas por residuos de cisteína, y dichas cisteínas forman un enlace disulfuro entre la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR.

Con o sin el susodicho enlace intercatenario introducido, los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2

del TCR pueden estar conectadas mediante el enlace disulfuro nativo establecido entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

Los TCR de la presente descripción pueden comprender un marcador detectable seleccionado del grupo consistente en radionúclidos, fluoróforos y biotina. Los TCR de la presente descripción pueden estar conjugados con un principio terapéuticamente activo, como un radionúclido, un agente quimioterápico o una toxina.

En una forma de realización, un TCR de la presente descripción portador de al menos una mutación de la cadena alfa y/o de al menos una mutación de la cadena beta presenta una glucosilación modificada en comparación con el TCR no mutado.

En una forma de realización, un TCR que comprende al menos una mutación en su cadena alfa y/o en su cadena beta posee una afinidad de unión y/o una semivida de unión con un complejo de péptido de IGF2BP3-molécula HLA, que como mínimo duplica la de un TCR cuya cadena alfa y/o beta no está(n) mutada(s). La potenciación de la afinidad de los TCR específicos de tumor, y su aprovechamiento, depende de la existencia de una franja de afinidades óptimas de tales receptores. La existencia de tal franja se basa en las observaciones de que los TCR específicos para patógenos restringidos a HLA-A2 presentan valores de K_D que en general son unas 10 veces menores que los TCR específicos para los autoantígenos asociados a tumor restringidos a HLA-A2 (Aleksic *et al.* 2012; Kunert *et al.* 2013). Ahora sabemos que a pesar de que los antígenos tumorales tienen el potencial de ser inmunogénicos, puesto que los tumores se originan a partir de las propias células del individuo, solo las proteínas mutadas o las proteínas con un procesamiento traduccional alterado serán detectadas como extrañas por el sistema inmunitario. Los antígenos que están regulados al alza o sobreexpresados (llamados autoantígenos) no inducen necesariamente una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor: Los linfocitos T que expresan TCR que son altamente reactivos contra dichos antígenos son seleccionados negativamente en el timo en un proceso conocido como tolerancia central (Xing *et al.* 2012; Ruella *et al.* 2014; Sharpe *et al.* 2015), lo que significa que solo pervivirán los linfocitos T cuyos TCR presenten una baja afinidad hacia los autoantígenos. Así pues, la afinidad de los TCR o de las variantes de la presente descripción hacia la IGF2BP3 puede ser potenciada mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Una «composición farmacéutica» es una composición apta para la administración a un ser humano en un contexto médico. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es estéril y se fabrica conforme a las directrices de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen asimismo al menos una célula hospedadora que expresa un TCR de la presente descripción, contenida en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden incluir excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables.

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, (Kibbe, 2000). La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Formulaciones a título de ejemplo se hallarán, por ejemplo, en EP2112253, que a modo de referencia se incorpora íntegramente a la presente memoria.

Otro aspecto más de la descripción proporciona ácidos nucleicos (por ejemplo, polinucleótidos) que codifican un péptido, variantes de péptido, TCR y variantes de TCR de la descripción. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, monocatenarios y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato y que pueden contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la descripción proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido conforme a la descripción.

Se han desarrollado diversos métodos para unir polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo, a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de ADN se le pueden añadir prolongaciones de homopolímeros complementarios para insertarlo en el vector de ADN. El vector y el segmento de ADN se unen a continuación por medio de puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Otro método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores son los ligadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción. Existen ligadores sintéticos comerciales que contienen diversas dianas para las endonucleasas de restricción que facilitan varios proveedores como International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE. UU.

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la descripción se sirve de la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki RK y cols. (Saiki *et al.*, 1988)). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo, diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

En un aspecto, con el fin de obtener los linfocitos que expresan los TCR de la presente descripción, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta de la presente descripción se clonan en vectores de expresión, como retrovirus gamma o lentivirus. Se crean los virus recombinantes y se analiza su funcionalidad, como la especificidad hacia el antígeno y la avidéz funcional. A continuación se toma una parte alícuota del producto final para transducir a la población destinataria de linfocitos T (generalmente purificada a partir de las PBMC del paciente), que se expande antes de administrarla vía infusión al paciente.

En otro aspecto, para obtener linfocitos T que expresen TCR de la presente descripción, los ARN del TCR se sintetizan con técnicas conocidas en la técnica, como por ejemplo, sistemas de transcripción *in vitro*. A continuación los ARN del TCR sinteti-

zados *in vitro* se introducen mediante electroporación en linfocitos T CD8+ primarios procedentes de donantes sanos para reexpresar las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta específicas del tumor.

Las cadenas del TCR introducidas en un linfocito T de sangre periférica pueden competir con cadenas de TCR endógenas por su asociación con el complejo CD3, que es necesario para la expresión del TCR en la superficie celular. Puesto que la expresión profusa del TCR en la superficie celular es esencial para conferir la sensibilidad adecuada para la activación por las células que expresan el antígeno tumoral diana (Cooper *et al.*, 2000; Labrecque *et al.*, 2001), las estrategias que potencian la expresión de los genes de las cadenas alfa y beta del TCR son importantes en la terapia génica con TCR.

Con el fin de aumentar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden enlazarse funcionalmente con promotores potentes, como repeticiones terminales largas de retrovirus (LTR), citomegalovirus (CMV), virus de citoblastos murino (MSCV) U3, fosfoglicerato-cinasa (PGK), β -actina, ubiquitina y un promotor compuesto de virus símico 40 (SV40)/CD43, el factor de elongación (EF)-1a y el promotor del virus formador de focos en el bazo (SFFV) (Joseph *et al.*, 2008). En una forma de realización preferida, el promotor es heterólogo con respecto al ácido nucleico que se expresa.

Además de promotores potentes, los casetes de expresión del TCR de la presente descripción pueden contener otros elementos adicionales para potenciar la expresión del transgén, como un tracto central polipurínico (cPPT), el cual promueve la traslocación nuclear de los constructos lentivíricos (Follenzi *et al.*, 2000), o el elemento regulador postrancricional del virus de la marmota (wPRE), que aumenta el nivel de expresión del transgén al reforzar la estabilidad del ARN (Zufferey *et al.*, 1999).

Las cadenas alfa y beta de un TCR de la presente invención pueden ser codificadas por ácidos nucleicos insertados en vectores separados, o pueden serlo por polinucleótidos insertados en un mismo vector.

Alcanzar un alto nivel de expresión del TCR en la superficie celular exige que tanto las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido se transcriban en abundancia. Con ese fin, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción se pueden clonar en constructos bicistrónicos en un mismo vector, los cuales han demostrado ser capaces de superar ese obstáculo. La inserción de un sitio de entrada intrarribosómico del virus (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta da pie a la expresión coordinada de ambas cadenas, porque ambas son generadas a partir de un único transcrito que se escinde en dos proteínas durante la traducción, asegurando así la producción equimolar de ambas (Schmitt *et al.* 2009).

Los codones de los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden ser optimizados para potenciar la expresión en la célula hospedadora. La redundancia del código genético permite que algunos aminoácidos sean codificados por más de un codón, pero ciertos codones son menos «idóneos» que otros por la disponibilidad relativa de los ARNt correspondientes, entre otros factores (Gustafsson *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la modificación de las secuencias génicas de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de modo tal que cada aminoácido sea codificado por el codón más idóneo para la expresión génica en mamíferos, así como la supresión de los motivos que provocan inestabilidad en el ARNm o de los sitios de escisión ocultos mejora notablemente la expresión génica de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta (Scholten *et al.*, 2006).

Además, el emparejamiento erróneo entre las cadenas de TCR introducidas y las endógenas puede derivar en la adquisición de especificidades que supongan un riesgo significativo para la autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros mixtos de las cadenas del TCR puede reducir el número de moléculas disponibles para formar complejos TCR correctamente aparejados, y por tanto reducir notablemente la avidez funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball *et al.*, 2007).

A fin de reducir el emparejamiento erróneo se puede modificar el dominio C-terminal de las cadenas del TCR introducidas que forman parte de la presente descripción para promover la afinidad entre las cadenas, al tiempo que reducir las posibilidades de que esas cadenas introducidas se emparejen con los TCR endógenos. Tales es-

trategias pueden consistir en: La sustitución de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta humanas con sus contrapartidas murinos (dominio C-terminal murinizado); la creación de un segundo enlace disulfuro entre las cadenas en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína tanto en las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido (modificación con cisteína); intercambiar los residuos que interactúan de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta («*knob-in-hole*»); y la fusión directa de los dominios variables de ambas cadenas con el CD3 ζ (fusión con CD3 ζ). (Schmitt *et al.* 2009).

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la descripción. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la descripción puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora adecuada a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la descripción. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes de EE. UU. N.º 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648, que se incorporan a la presente memoria a modo de referencia.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la descripción se puede unir con una amplia variedad de secuencias distintas de ADN para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio

vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como, por ejemplo, de resistencia a antibióticos.

Otra alternativa consiste en incorporar el gen de ese rasgo seleccionable en otro vector con el que se cotransforma la célula hospedadora.

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la descripción se cultivarán durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas reveladas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, ser recuperado.

Son muchos los sistemas de expresión conocidos, como bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, etc.), hongos filamentosos (género *Aspergillus*, etc.), células vegetales, animales o de insectos. Preferiblemente, el sistema consistirá en células de mamífero, como las células CHO disponibles de la ATCC Cell Biology Collection.

En una forma de realización, se modifica con técnicas de ingeniería genética una célula hospedadora para que exprese un TCR de la presente descripción. En formas de realización preferidas, la célula hospedadora es un linfocito T humano o una célula progenitora de linfocito T humana. En algunas formas de realización el linfocito T o la célula progenitora de linfocito T se obtienen de un paciente con cáncer. En otras formas de realización el linfocito T o la célula progenitora de linfocito T se obtienen de un donante sano. Las células hospedadoras de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas con respecto al paciente que va a ser tratado. En una forma de realización, la célula hospedadora es un linfocito T gamma/delta transformado para expresar un TCR alfa/beta.

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o del SV40 con una cola de poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE. UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Algunos vectores plasmídicos de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (YIp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo, de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, expresión en el citoplasma o secreción, y marcaje de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de la proteína muy elevados, de hasta 1 mg/l en células COS. En estirpes celulares menos potentes los niveles de proteínas suelen rondar ~0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 genera niveles elevados de replicación del ADN en células COS que toleran la replicación del SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la b-lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, poliA de hGH, y el origen del f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotipsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos anti-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

En otra forma de realización dos o más péptidos o variantes peptídicas de la descripción se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de cuentas»). Al hacerlo, los péptidos o las variantes peptídicas se pueden enla-

zar o fusionar juntas mediante segmentos de aminoácidos enlazantes, como, por ejemplo, LLLLLL, o se pueden unir sin ningún otro péptido adicional entre ellos. Estos constructos también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

La presente descripción también se refiere a una célula hospedadora transformada con un constructo de vector polinucleotídico de la presente descripción. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como, por ejemplo, las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, Maryland, EE. UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, Maryland, EE. UU. (N.º ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9, que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas, por ejemplo, en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente descripción se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véase, por ejemplo, Cohen y cols. (Cohen *et al.*, 1972) y

(Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman et al. (Sherman *et al.*, 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo, el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o la transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

Las células transformadas con éxito, es decir, las que contengan un constructo de ADN de la presente descripción, se pueden identificar con técnicas bien conocidas como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la descripción son útiles para la preparación de péptidos de la descripción, por ejemplo, las células bacterianas, de levadura e insecto. Con todo, para ciertos métodos terapéuticos pueden ser útiles otras células hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar células presentadoras de antígeno como las células dendríticas para expresar los péptidos de la descripción de tal forma que puedan ser cargados en las moléculas MHC oportunas. Así pues, la presente descripción proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la descripción.

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene ácido prostático fosfatasa (PAP) fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU. (FDA) el 29 de abril de 2010 para tratar el cáncer de próstata hormonorrefractario metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2006).

Otro aspecto más de la descripción proporciona un método para la producción de un péptido o de su variante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hos-

pedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la descripción se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante pueden ser preparados para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter *et al.*, 2012).

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Una perspectiva general se puede consultar, por ejemplo, en Teufel y cols. (Teufel *et al.*, 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo, con un epítipo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto, tal y como se ha indicado antes.

La presente descripción se refiere, además, a aptámeros. Los aptámeros (véase, por ejemplo, WO 2014/191359 y la bibliografía citada en ella) son moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios cortas, que se pueden plegar hasta adoptar estructuras tridimensionales definidas y que reconocen estructuras diana específicas. Parecen

ser alternativas adecuadas para el desarrollo de terapias dirigidas. Los aptámeros han demostrado su unión selectiva a una gama de dianas complejas con elevada afinidad y especificidad.

En la pasada década han sido descubiertos aptámeros que reconocen moléculas situadas en la superficie celular que constituyen un medio para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas. La toxicidad y la inmunogenicidad de los aptámeros es, hasta donde se sabe, prácticamente nula, por lo que son candidatos prometedores para aplicaciones biomédicas. Y son aptámeros, por ejemplo, aptámeros que reconocen el antígeno de membrana específico de la próstata, los que han sido empleados con éxito en terapias dirigidas y han demostrado su funcionalidad en modelos de xenoinjerto *in vivo*. Además, se han descubierto aptámeros que reconocen estirpes de células tumorales específicas.

Es posible seleccionar aptámeros de ADN para desvelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro contra varias células cancerosas, y particularmente las derivadas de tumores sólidos, en tanto que las células sanas primarias y no oncogénicas no son reconocidas. Si los aptámeros descubiertos reconocieran no solo un subtipo de tumor concreto sino que interaccionaran con una serie de tumores, se convertirían en una herramienta aplicable para el diagnóstico y la terapéutica de amplio espectro.

Además, las investigaciones de su unión a células mediante la citometría de flujo han demostrado que los aptámeros presentan una excelente afinidad aparente en la escala nanomolar.

Los aptámeros resultan útiles para fines diagnósticos y terapéuticos. En un aspecto, al menos uno o más aptámeros son captados por las células tumorales y pueden actuar así como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes anti-neoplásicos como ARNsi en las células tumorales.

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de los péptidos o los TCR que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con cualquiera de las SEQ

ID N.º 14 a SEQ ID N.º 15, conforme con la presente descripción con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

En una forma de realización la descripción proporciona un método para producir un TCR como el descrito en la presente memoria, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora capaz de expresar el TCR en las condiciones idóneas para promover la expresión de dicho receptor.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR acorde con la presente descripción, comprendiendo dicho método: La incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/IGF2BP3; la incubación de las PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran avidéz mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR acorde con la presente descripción, comprendiendo dicho método: La incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/p286-1Y2L; la incubación de las PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran avidéz mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR acorde con la presente descripción, comprendiendo dicho método: La incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/p286-1Y2L9L; la incubación de las PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran avidéz mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR conforme a la presente descripción, comprendiendo dicho método: La obtención de un ratón transgénico con los *locus* enteros del gen TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el IGF2BP3-001; la incubación de las PBMC obtenidas de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran avidez mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR conforme a la presente descripción, comprendiendo dicho método: La obtención de un ratón transgénico con los *locus* enteros del gen TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el p286-1Y2L; la incubación de las PBMC obtenidas de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran avidez mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, a un método para identificar y aislar un TCR conforme a la presente descripción, comprendiendo dicho método: La obtención de un ratón transgénico con los *locus* enteros del gen TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el p286-1Y2L9L; la incubación de las PBMC obtenidas de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran avidez mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, al método acorde con la descripción, en el que el linfocito T comprende un vector de expresión capaz de expresar un TCR acorde con la presente descripción.

La presente descripción se refiere, además, a un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante el IGF2BP3, método que comprende la administración al paciente de un número efectivo de TCR, TCR solubles y/o linfocitos T de acuerdo con la presente descripción.

La presente descripción se refiere, además, al uso de cualquier TCR descrito, un ácido nucleico acorde con la presente descripción, un vector de expresión acorde con la presente descripción, una célula acorde con la presente descripción, o un linfocito T citotóxico activado acorde con la presente descripción como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La presente descripción se refiere, además, a un uso conforme a la presente descripción en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente descripción se refiere, además, al uso acorde con la descripción, en el que las células cancerosas son células de cáncer de pulmón amicrocítico u otras células de tumores sólidos o hematológicos, como el cáncer de pulmón amicrocítico, el cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago.

La presente descripción se refiere, además, a un método para destruir células cancerosas que comprende la puesta en contacto de las células cancerosas con una célula hospedadora de la presente descripción. En una forma de realización, la célula hospedadora expresa un TCR de la presente descripción. En una forma de realización, la célula hospedadora es un linfocito T o una célula progenitora de linfocito T. En una forma de realización, En una forma de realización preferida, las células cancerosas se seleccionan entre células de cáncer de pulmón amicrocítico u otras células de tumores sólidos o hematológicos, como el cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar

y vías biliares y cáncer de esófago. En algunas formas de realización, el TCR se conjuga con un agente terapéuticamente activo. En ciertas formas de realización, el agente terapéuticamente activo se selecciona de un grupo consistente en radionúclidos, agentes quimioterápicos y toxinas.

La presente invención se refiere, además, a un método de tratamiento contra el cáncer que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una célula hospedadora de la presente invención. En una forma de realización, la célula hospedadora expresa un TCR de la presente descripción. En una forma de realización, la célula hospedadora es un linfocito T o una célula progenitora de linfocito T. En una forma de realización, la célula hospedadora es autóloga con respecto al sujeto a tratar. En otra forma de realización, la célula hospedadora es alogénica con respecto al sujeto a tratar. En una forma de realización preferida, las células cancerosas se seleccionan entre células de cáncer de pulmón amicrocítico u otras células de tumores sólidos o hematológicos, como el cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago.

En algunas formas de realización, el TCR se conjuga con un agente terapéuticamente activo. En la presente memoria, el término «agente terapéuticamente activo» designa un compuesto usado para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno médico indeseable. En una forma de realización, el agente terapéuticamente activo se usa para tratar a prevenir el cáncer. En ciertas formas de realización, el agente terapéuticamente activo se selecciona de un grupo consistente en radionúclidos, agentes quimioterápicos y toxinas.

Los TCR, los ácidos nucleicos y las células hospedadoras de la presente descripción, así como las composiciones farmacéuticas de los mismos, pueden ser administrados a un sujeto que los necesite a través de vías conocidas en la técnica, y que pueden variar dependiendo del tipo de cáncer que se va a tratar. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, la administración local (como la intratumoral) y la

administración parenteral como la subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intraportal o intrahepática. En una forma de realización preferida, los TCR, los ácidos nucleicos o las células hospedadoras de la presente descripción, o las composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran a un sujeto por medio de infusión local, por ejemplo, con una bomba de infusión y/o un sistema de catéter, en un sitio que se va a tratar, como un tumor sólido. En una forma de realización, una composición de la presente descripción se infunde en un tumor sólido, en un vaso sanguíneo que irriga el tumor sólido, y/o en una zona circundante al tumor sólido.

En formas de realización preferidas, las composiciones de la presente descripción se administran a un sujeto con una pauta posológica de al menos dos administraciones separadas por un lapso mínimo de 24 horas. Las pautas posológicas adecuadas para la administración de composiciones de la presente descripción incluyen, por ejemplo, una vez al día, una vez cada dos días y una vez cada tres días. Son aún más preferibles pautas posológicas del orden de una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada 15 días, una vez al mes y dos veces al mes. En formas de realización concretas se emplea una pauta escalonada de la dosis, en la que el sujeto recibe progresivamente dosis crecientes a lo largo de varios días, semanas o meses.

Las dosis efectivas de las células hospedadoras que expresan los TCR de la presente invención incluyen, por ejemplo, al menos unas 10^4 , al menos unas 10^5 , al menos unas 10^6 , al menos unas 10^7 , al menos unas 10^8 , al menos unas 10^9 , y al menos unas 10^{10} células hospedadoras por dosis. En una forma de realización, las células hospedadoras de la presente descripción se administran en dosis aproximadas de entre 10^4 y 10^{10} células por dosis, preferentemente en dosis aproximadas de entre 10^5 y 10^9 células por dosis. En formas de realización preferidas, las dosis se administran en una pauta posológica a lo largo de al menos dos o más ciclos de administración.

La presente invención se refiere, además, a un método para tratar el cáncer que comprende la administración de un TCR, un ácido nucleico o una célula hospedadora de la presente descripción en combinación con al menos un agente quimioterápico y/o radioterapia.

También se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita, el cual comprende:

- a) Aislamiento de una célula de dicho sujeto
- b) Transformación de la célula con al menos un vector que codifique un TCR de la presente descripción para producir una célula transformada
- c) Expansión de la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) Administración de la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita, el cual comprende:

- a) Aislamiento de una célula procedente de un donante sano
- b) Transformación de la célula con un vector que codifique un TCR de la presente descripción para producir una célula transformada
- c) Expansión de la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) Administración de la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se proporciona un método para detectar el cáncer en una muestra biológica, el cual comprende:

- a) Puesta en contacto de la muestra biológica con un TCR de la presente descripción
- b) Detección de la unión del TCR a la muestra biológica.

En ciertas formas de realización, el método para la detección del cáncer se lleva a cabo en condiciones *in vitro*, *in vivo* o *in situ*.

La presente descripción se refiere, además, a proteínas marcadoras y a biomarcadores concretos basados en los péptidos acordes con la presente descripción, aquí denominados «dianas» que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer de pulmón amicrocítico. La presente descripción también se refiere al uso de esas novedosas dianas para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto más de la descripción proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble (sTCR) que reconozca un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy *et al.*, 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter *et al.*, 2003; Card *et al.*, 2004; Willcox *et al.*, 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191), dominios que reclutan células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en células diana. En otro aspecto, éste se expresa en linfocitos T usados para la transferencia adoptiva. Véanse, por ejemplo, WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1 y WO 2013/057586A1, cuyo contenido se incorpora íntegramente a modo de referencia.

Además, los péptidos y/o los TCR o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente descripción se pueden utilizar para confirmar el diagnóstico histopatológico de cáncer a partir de una muestra de biopsia.

Los anticuerpos o los TCR también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo o el TCR se marcan con un radionúclido (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor pueda ser localizado con gammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (K_d) es inferior a $1 \times 10 \mu\text{M}$.

Los anticuerpos o los TCR para uso diagnóstico pueden ser marcados con sondas adecuadas para posibilitar la detección con diferentes métodos de diagnóstico por la imagen. Los métodos para la detección de sondas incluyen, entre otros, microscopía de fluorescencia, óptica convencional, confocal y electrónica; resonancia magnética

y espectroscopía; radioscopia, tomografía computadorizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, entre otras, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Los anticuerpos y/o TCR pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La fijación de sondas a los anticuerpos y/o TCR incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo o el TCR, y la unión covalente de un compuesto quelante para unir la sonda, entre otros métodos consabidos en la técnica. Para las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra de tejido patológico puede ser reciente o congelada, o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante como el formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de las proteínas.

EJEMPLOS

La utilización de las condiciones alorreactivas permite eludir la autotolerancia y obtener linfocitos T provistos de elevada avidez en comparación con los linfocitos T derivados de «montajes» autólogos, esto es, de los propios pacientes. Ejemplos de tales condiciones incluyen la generación *in vitro* de linfocitos T específicos de péptido y reactivos a HLA alogénicos (Sadovnikova *et al.* 1998; Savage *et al.* 2004; Wilde *et al.* 2012), y la inmunización de ratones transgénicos para moléculas de MHC humanas o TCR humanos (Stanislowski *et al.* 2001; Li *et al.* 2010).

Ejemplo 1

Generación *in vitro* de linfocitos T específicos de péptido y reactivos a HLA alogénicos (Savage *et al.* 2004)

Se emplearon PBMC procedentes de donantes sanos, tanto positivos como negativos para HLA-A*02, que concedieron su consentimiento informado. Se adquirieron monómeros HLA-A2 de clase I biotinilados y recombinantes y tetrámeros A2 fluorescentes que contenían el IGF2BP3-001 de MBLI (Woburn, MA, EE. UU.). Las PBMC se incubaron con anti-CD20SA diluido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron con los

monómeros A2/IGF2BP3-001 biotinilados durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se sembraron a razón de 3×10^6 células/pocillo en placas de 24 pocillos en RPMI con suero AB humano al 10%. El primer día se añadió interleucina 7 a razón de 10 ng/ml (IL-7; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) y el cuarto día IL-2 a razón de 10 U/ml (Chiron, Harefield, Reino Unido). Durante un período de 5 semanas a las células se las reestimuló semanalmente con PBMC recién extraídas, se mezclaron con células que habían respondido en una proporción 1:1 y se sembraron a razón de 3×10^6 /pocillo en placas de 24 pocillos.

Para obtener los linfocitos T de gran avidez, se incubaron unas 10^6 PBMC con el tetrámero HLA-A2/IGF2BP3-001 conjugado con ficoeritrina (PE) (obtenidas de MBLI) durante 30 minutos a 37 °C, y acto seguido con anticuerpo anti-CD8 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/aloficocianina (APC) durante 20 minutos a 4 °C antes de proceder al análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)–Calibur. La selección se efectuó con un citómetro de flujo FACS-Vantage (Becton Dickinson, Cowley, Oxford, Reino Unido). Las células tetrámero-positivas seleccionadas se expandieron en placas de 24 pocillos sembrando en cada pocillo 2×10^5 células, acompañadas a modo de nodrizas por 2×10^6 PBMC A2-negativas irradiadas, junto con 2×10^4 microperlas CD3/CD28 /ml (Dynal, Oslo, Noruega) e IL-2 (1000 U/ml). Los linfocitos T de gran avidez así obtenidos se usaron a continuación para identificar y aislar los TCR con técnicas conocidas en la materia, como la 5'-RACE monocelular (Amplificación rápida de los extremos de ADNc). Acto seguido, los ADN de TCR no redundantes se analizaron para determinar las secuencias de aminoácidos/ADN y se los clonó en vectores de expresión con métodos consabidos en la técnica.

Ejemplo 2: Clonación de los TCR

Los métodos para la clonación de TCR son conocidos en la técnica, como por ejemplo, los descritos en la patente de EE. UU. 8.519.100, que se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia sobre dichos métodos. Para amplificar la región variable de la cadena alfa se usan el oligonucleótido A1, específico de la secuencia de la región variable de la cadena alfa (ggaattccatgatgagtcacaaggagaagaagatcc, SEQ ID N.º 22) que codifica la diana de restricción para NdeI, una metionina introducida para lograr el inicio eficiente de la expresión en bacterias, y el oligonu-

cleótido A2, específico de la secuencia de la región constante de la cadena alfa (ttgtcagtcgacttagagttctctcagctggtacacg, SEQ ID N.º 23) que codifica la diana de restricción para Sall. En el caso de la cadena beta, la región variable de la misma se amplifica mediante el oligonucleótido B1, específico de la secuencia de la región variable de la cadena beta (tctctcatatggatggtggaattactcaatcccaa, SEQ ID N.º 24) que codifica la diana de restricción para NdeI, una metionina introducida para lograr el inicio eficiente de la expresión en bacterias, y el oligonucleótido B2, específico de la secuencia de la región constante de la cadena beta (tagaaaccggtggccaggcacacacagtggtgc, SEQ ID N.º 25) que codifica la diana de restricción para AgeI.

Las secuencias de ADN codificantes de la cadena alfa del TCR cortadas con NdeI y con Sall se ligan en el vector pGMT7+C α , previamente cortado con NdeI y XhoI. Las secuencias de ADN codificantes de la cadena beta del TCR cortadas con NdeI y AgeI se ligan en otro vector pGMT7+C β distinto, también previamente cortado con NdeI y AgeI. Los plásmidos ligados se introducen por transformación en células competentes de la cepa de *Escherichia coli* denominada XL1-Blue que a continuación se siembran en placas de LB/agar con ampicilina 100 μ g/ml. Tras permanecer en incubación hasta el día siguiente a 37° C, se repican colonias aisladas que se cultivan hasta el día siguiente en 10 ml de LB con ampicilina 100 μ g/ml a 37° C y en agitación. Los plásmidos clonados se purifican con un kit Miniprep (Qiagen) y el inserto se secuencia con un secuenciador automático de ADN (Lark Technologies).

Los TCR R10P1A7, codificantes de las cadenas alfa y beta de TCR específicas del tumor, se aislaron y se amplificaron a partir de linfocitos T procedentes de donantes sanos. Las células de los donantes sanos se estimularon en condiciones *in vitro* siguiendo el método descrito por Walter et. al. 2003. Las células específicas de la diana se seleccionaron una a una con multímeros específicos de la diana antes de proceder al aislamiento de los TCR. Las secuencias de TCR se aislaron con la 5'-RACE mediante métodos ordinarios como los descritos, por ejemplo, en *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 4ª edición, de Green y Sambrook. El TCR R10P1A7 se aisló de un donante HLA-A2 negativo. Se secuenciaron las regiones variables de las cadenas alfa y beta de los TCR R20P1H7, R7P1D5 y R10P2G12.

Se descubrió que el dominio variable alfa del TCR R10P1A7 tenía una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 22 a 130 de la SEQ ID N.º 2. Se descubrió que el dominio variable beta del TCR R10P1A7 tenía una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 26 a 139 de la SEQ ID N.º 10.

Se pueden usar fagotecas para crear archivos de variantes de TCR con los que identificar mutantes provistos de alta afinidad. La fagoteca de TCR y los métodos de cribado descritos en (Li et al, (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) se pueden aplicar a un TCR de referencia seleccionado entre los TCR descritos en la Tabla 1.

Por ejemplo, las tres regiones CDR de la secuencia de la cadena alfa de la SEQ ID N.º 2 y las tres regiones CDR de la secuencia de la cadena beta de la SEQ ID N.º 10 pueden ser sometidas a mutagénesis, y buscar y cribar en cada biblioteca de CDR por separado.

En consecuencia, se pueden identificar aquellos TCR cuyas afinidades y/o semividas de unión dupliquen como mínimo las del TCR de referencia (y, por tanto, implícitamente dupliquen como mínimo la del TCR nativo).

Los heterodímeros de TCR se vuelven a replegar con el método que incluye la introducción de cisteínas en las regiones constantes para crear un puente disulfuro artificial entre las cadenas. De esa forma se preparan los TCR siguientes, a saber: (a) la cadena beta del TCR de referencia junto con cadenas alfa mutadas; (b) la cadena alfa del TCR de referencia junto con cadenas beta mutadas; y (c) combinaciones diversas de cadenas alfa y beta que incluyen dominios variables mutantes.

La interacción entre los TCR solubles de alta afinidad unidos por puentes disulfuro, y las variantes de estos TCR, con el complejo formado por el péptido nativo KIQEILTQV (SEQ ID N.º 1) y la molécula HLA se puede analizar con el método BIAcore.

Las variantes de los TCR provistas de alta avidez también se pueden seleccionar a partir de una biblioteca de CDR mutantes introducida en levaduras o en linfocitos T (Holler et al. 2003; Chervin et al. 2008). Las variantes de TCR que sean candidatas

brindan de ese modo orientación acerca de las mutaciones inducidas que es preciso conseguir en las CDR de los TCR para obtener las variantes de TCR de gran avidéz (Robbins *et al.* 2008; Zoete *et al.* 2007).

Ejemplo 3: Genomanipulación de linfocitos T autólogos

Los linfocitos T se pueden genomanipular para que expresen TCR de gran avidéz (para las llamadas terapias con TCR) o receptores quiméricos de antígeno derivados de la fusión de proteínas (CAR) provistos de una especificidad de antígeno reforzada hacia el complejo MHC I/IGF2BP3-001 o el complejo MHC II/IGF2BP3-001. En un aspecto, esta estrategia solventa algunas de las limitaciones que acarrear la tolerancia central y periférica, y genera linfocitos T que serán más eficientes a la hora de reconocer y atacar los tumores sin necesidad de la activación *de novo* de los linfocitos T en el paciente.

En un aspecto, con el fin de obtener linfocitos T que expresen los TCR de la presente descripción, los ácidos nucleicos codificantes de las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta identificadas y aisladas, como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, se clonan en vectores de expresión, como retrovirus gamma o lentivirus. Se crean los virus recombinantes y se analiza su funcionalidad, como la especificidad antigénica y la avidéz funcional. A continuación se toma una parte alícuota del producto final para transducir a la población destinataria de linfocitos T (generalmente purificada a partir de las PBMC del paciente), que se expande antes de administrarla vía infusión al paciente.

En otro aspecto, para obtener linfocitos T que expresen los TCR de la presente descripción, los ARN del TCR se sintetizan con técnicas conocidas en la materia, como por ejemplo, sistemas de transcripción *in vitro*. A continuación los ARN de TCR que han sido sintetizados *in vitro* se introducen mediante electroporación en linfocitos T CD8+ primarios procedentes de donantes sanos para reexpresar las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta específicas del tumor.

Para probar si los TCR exógenos se expresan funcionalmente en la superficie celular de los linfocitos T transformados, se usó una técnica de tinción por tetrámeros para detectar los linfocitos T que se unían a complejos MHC/IGF2BP3-001. Como se

aprecia en la FIG. 5 y la Tabla 2, el porcentaje observado de linfocitos T específicos CD3-positivos fue mayor entre los linfocitos T CD8+ que expresaban el TCR revelados por la tinción fluorescente con tetrámeros de MHC/IGF2BP3-001 que con los tetrámeros de MHC/péptido no relacionado (p. ej., NYESO1-001) o en los controles no transformados, con valores del 6,78%, 1,53% y 1,73%, en ese mismo orden. A modo de control, se transformaron linfocitos T CD8+ primarios con un TCR de control, el TCR 1G4, del que es sabido que se une específicamente al complejo MHC/NYESO1-001, el cual fue detectado sin dificultad con los tetrámeros MHC/NYESO1-001, con un porcentaje del 17,69%. Estos resultados indican que el TCR R10P1A7 se expresa en la superficie de los linfocitos T y que se une específicamente al complejo MHC/IGF2BP3-001. Las cadenas alfa y beta del TCR 1G4 se exponen en las SEQ ID N.º 20 y la SEQ ID N.º 21, respectivamente.

Cadena alfa del 1G4 (SEQ ID N.º 20):

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAI-
YNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAAS-
QPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPDA-
VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRS-
MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKS-
FETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

Cadena beta del 1G4 (SEQ ID N.º 21):

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMN-
HEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRL-
SAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVA-
VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL-
KEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDE-
WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATIL-
YEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

A fin de determinar la especificidad y la afinidad de los TCR, los linfocitos T CD8+ transformados se incubaron conjuntamente con células diana cargadas con el IGF2BP3-001 o con células diana cargadas con el péptido homólogo pero no relacionado CLUA-001 (SEQ ID N.º 26), CHCHD6-001 (SEQ ID N.º 27), CDC42BPG-

001 (SEQ ID N.º 28), PARP14-002 (SEQ ID N.º 29), SYNE2-001 (SEQ ID N.º 30), IFT7-001 (SEQ ID N.º 31), DHRS12-001 (SEQ ID N.º 32), STX12-001 (SEQ ID N.º 33), EEA-001 (SEQ ID N.º 34), SENP7-001 (SEQ ID N.º 35), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 36), seguido por un ensayo de liberación de IFN- γ . Como controles se utilizaron células diana no cargadas y linfocitos T CD8+ solos. La secreción de IFN- γ por parte de los linfocitos T CD8+ indica la activación de los linfocitos T con actividad citotóxica.

Tabla 2

Código del TCR	Donante/HLA-A2 (+ o -)	IFN- γ (pg/ml)	CE ₅₀	% de linfocitos T CD8+ primarios positivos para tetrámeros de IGF2BP3-001	% de linfocitos T CD8+ primarios positivos para tetrámeros de NYESO1-001
R10P1A7	HBC-688/(-)	175	~1 nM	6,78	1,53

Tal y como se aprecia en la FIG. 6, los linfocitos T CD8+ primarios sometidos a la electroporación para introducir el ARN codificante del TCR R10P1A7 de la presente descripción que fueron incubados conjuntamente con células diana cargadas con el IGF2BP3-00, segregaron niveles mucho mayores de IFN- γ que los estimulados con las células diana cargadas con el péptido de control y que los linfocitos de control. El análisis de la titulación del péptido diana reveló una CE₅₀ en torno a 1 nM (Tabla 2). Estos resultados sugieren que el TCR R10P1A7 de la presente invención puede estimular la actividad de los linfocitos T citotóxicos, como, por ejemplo, la secreción de IFN- γ , mediante su interacción específica con el complejo de MHC/IGF2BP3-001.

Con el fin de determinar el motivo de unión del TCR R10P1A7 con el complejo de MHC/IGF2BP3-001, se llevó a cabo un análisis de barrido posicional con alanina en cada uno de los 9 aminoácidos que conforman el péptido IGF2BP3-001. La Tabla 3 muestra los péptidos IGF2BP3-001 con las correspondientes sustituciones por alanina.

Tabla 3

Posición:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IGF2BP3-001 (SEQ ID N.º 1)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A1 (SEQ ID N.º 37)	A	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A2 (SEQ ID N.º 38)	K	A	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A3 (SEQ ID N.º 39)	K	I	A	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A4 (SEQ ID N.º 40)	K	I	Q	A	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A5 (SEQ ID N.º 41)	K	I	Q	E	A	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A6 (SEQ ID N.º 42)	K	I	Q	E	I	A	T	Q	V
IGF2BP3-001 A7 (SEQ ID N.º 43)	K	I	Q	E	I	L	A	Q	V
IGF2BP3-001 A8 (SEQ ID N.º 44)	K	I	Q	E	I	L	T	A	V
IGF2BP3-001 A9 (SEQ ID N.º 45)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	A

En resumen, los linfocitos T CD8⁺ transformados con el TCR R10P1A7 se incubaron conjuntamente con células diana cargadas con el IGF2BP3-001 y con los IGF2BP3-001-A1 a IGF2BP3-001-A9, o bien con el péptido de control NYESO1-001, para después ser sometidos al ensayo de liberación de IFN- γ que se ha descrito antes.

Los resultados del análisis de barrido posicional con alanina sobre el TCR R10P1A7 se muestran en la FIG. 7 y se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

TCR	Posiciones de IGF2BP3-001 que permiten la unión al TCR
R10P1A7	1, 3-7

El cribado del genoma entero en busca de péptidos que se unieran a A*02 provistos de un motivo idéntico no reveló ningún péptido con posible reactividad cruzada para el TCR R10P1A7. Tales resultados sugieren que el TCR descrito en la presente memoria exhibe un patrón de reconocimiento sumamente específico que comporta un riesgo reducido de efectos fuera de su diana.

Con el fin de determinar la eficacia de los linfocitos T que expresan los TCR descritos en la presente memoria, linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN del TCR R10P1A7 se incubaron conjuntamente con distintas estirpes de células cancerosas humanas, entre ellas la A-375 (estirpe celular de melanoma humano) y la T98G (estirpe celular de glioblastoma humano), ambas positivas para HLA-A2 y positivas para el IGF2BP3-001 (diana), así como con la SK-BR-3 (estirpe celular de cáncer de mama humano), que es negativa para el HLA-A2 y para el IGF2BP3-001, tras lo cual se los sometió al ensayo de liberación del IFN- γ .

Como se observa en la FIG. 8, la secreción de IFN- γ tuvo lugar tanto con las células A-375 como con las T98G, ambas positivas para el HLA-A2 y el IGF2BP3-001, pero no así con las células SK-BR-3, cuyos niveles basales de liberación de IFN- γ resultaron comparables a los del control constituido por células efectoras solas. Estos resultados indican que los linfocitos T que expresan el TCR R10P1A7 pueden desplegar específicamente actividad citotóxica dirigida contra las células cancerosas por la interacción del HLA-A2 con el IGF2BP3-001.

La presente descripción proporciona diversos TCR que son útiles para el tratamiento de cánceres y tumores, preferentemente el melanoma y el glioblastoma que sobre-presentan o que presentan exclusivamente el IGF2BP3-001.

Ejemplo 5: Genomanipulación de linfocitos T alogénicos

Los linfocitos T gamma-delta ($\gamma\delta$), que son linfocitos T efectores no convencionales implicados en la primera línea de defensa contra los patógenos, pueden interactuar con las células tumorales y erradicarlas sin el concurso del MHC a través de receptores activadores, entre otros, las cadenas gamma y delta del TCR. Estos linfocitos T $\gamma\delta$ muestran un fenotipo preactivado que permite la rápida producción de citocinas (IFN- γ y TNF- α) y una potente respuesta citotóxica tras la activación. Estos linfocitos T poseen actividad antitumoral contra muchos tipos de cáncer y sugieren que la inmunoterapia mediada por linfocitos T $\gamma\delta$ es factible y puede propiciar respuestas objetivas del tumor (Braza *et al.* 2013).

Los avances recientes con antígenos inmovilizados, anticuerpos monoclonales agonistas (AcM), células presentadoras de antígenos artificiales derivadas de tumor (aAPC), o combinaciones de AcM activadores y aAPC han logrado expandir con éxito linfocitos T gamma-delta con repertorios oligoclonales o policlonales de TCR. Por ejemplo, la proteína A relacionada con la cadena del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MICA) inmovilizada ha resultado ser un estímulo para linfocitos T que expresaban isotipos TCR δ 1, y anticuerpos activadores fijados sobre placa han expandido a linfocitos V δ 1 y V δ 2 en condiciones *ex vivo*. Se han producido cantidades clínicamente suficientes de TCR δ 1, TCR δ 2 y TCR δ 1^{neg}TCR δ 2^{neg} mediante el cultivo conjunto con aAPC, y estas subpoblaciones mostraron diferencias en el fenotipo de memoria y en la reactividad hacia los tumores en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Deniger *et al.* 2014).

Asimismo, los linfocitos T $\gamma\delta$ son susceptibles de ser modificados genéticamente, tal y como pone de manifiesto la introducción en ellos de cadenas alfa y beta de TCR (Hiasa *et al.* 2009). Otro aspecto de la presente descripción se refiere a la producción de linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan cadenas alfa y beta de TCR que se unen al IGF2BP3-001. Para ello, los linfocitos T $\gamma\delta$ se expanden mediante los métodos descritos por Deniger *et al.* 2014 y después a dichos linfocitos expandidos se los somete a transducción mediante virus recombinantes para que expresen los TCR que se unen al IGF2BP3-001 (como se describe en el ejemplo 3). Por último, los linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos con el virus se le infunden al paciente.

Lista de referencias bibliográficas

Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.

Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.

Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.

- Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.
- Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rughetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.
- Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009).
- Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.
- Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.
- Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.
- Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.
- Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.
- Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.
- Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.
- Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.

Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z, Kwon ED (2008). External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* *112*, 1471-1479.

Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* *88*, 273-280.

Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* *10*, e0118927.

Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* *8*, 743-750.

Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* *109*, 568-575.

Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* *11*, 1809-1814.

Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* *2011*, 795239.

Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* *151*, 1213-1218.

Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* *118*, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* *27*, 1255-1266.

Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H (2008). Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*

- Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.
- Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosenberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.
- Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.
- Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.
- Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.
- Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.
- Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 21, 431-437.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- Resnick MB, Sabo E, Kondratev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.
- Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.
- Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevoigt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.

Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.

Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammanull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.

Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.

Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.

Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Bühring HJ, Rammensee HG, Stevanović S. (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8

Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.

Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

Yantiss RK, Cosar E, Fischer AH (2008). Use of IMP3 in identification of carcinoma in fine needle aspiration biopsies of pancreas. *Acta Cytol.* 52, 133-138.