

NUEVOS RECEPTORES DE LINFOCITOS T E INMUNOTERAPIA BASADA EN EL USO DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención atañe a constructos que reconocen antígenos, en concreto antígenos de COL6A3. La invención proporciona en concreto nuevas moléculas basadas en receptores de linfocitos T (TCR) que son selectivas y específicas hacia el antígeno tumoral COL6A3. El TCR de la invención, así como los fragmentos de unión con el antígeno de COL6A3 y que derivan del mismo, están destinados al uso en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de enfermedades tumorales que expresan el COL6A3. Además se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los constructos reconocedores del antígeno de la invención, los vectores que comprenden esos ácidos nucleicos, las células recombinantes que expresan los constructos reconocedores del antígeno y las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención.

DESCRIPCION

Los colágenos constituyen una superfamilia de proteínas que intervienen en el mantenimiento de la integridad de varios tejidos. Los colágenos son proteínas de la matriz extracelular cuyo elemento estructural común es un dominio helicoidal triple. El colágeno VI es uno de los principales componentes estructurales de las microfibrillas. La unidad estructural básica del colágeno VI es un heterotrímero formado por cadenas de colágeno alfa-1(VI), alfa-2(VI) y alfa-3(VI). La cadena alfa-1(VI) está codificada por el gen COL6A1 y la cadena alfa-2(VI) por el gen COL6A2. La proteína codificada por el gen COL6A3 es la subunidad alfa-3 del colágeno de tipo VI (cadena de colágeno alfa-3(VI)) (Bertini et al., 2002 Eur. J. Paediatr. Neurol 6:193-8). Está demostrado que la expresión génica de COL6A3 aparece asociada con la progresión del cáncer de mama y aparece elevada en el cáncer de colon (Smith MJ, et al. "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification" British Journal of Cancer. 2009;100:1452-1464; Tilman G et al "Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells" Mol Cancer. 2007;6:80) y que puede servir como

marcador pronóstico del carcinoma colorrectal (Qiao J et al. "Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics" *Oncotarget*. 2015 Oct 6; 6(30): 29929–29946). En el genoma humano, el gen COL6A3 está localizado en el cromosoma 2q37 y contiene 44 exones. La proteína COL6A3 posee 3177 aminoácidos y contiene 12 dominios de tipo A del factor de Von Willebrand (vWA), un dominio de tipo 3 de la fibronectina y un dominio de la familia BPTI/Kunitz de inhibidores de las serina proteasas (KU).

Las dianas de la inmunoterapia basada en los linfocitos T están constituidas por epítopos peptídicos derivados de proteínas específicas de los tumores o asociadas a los mismos, 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 expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, normalmente están regulados 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).

El TCR es una proteína heterodimérica ubicada en la superficie celular que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que está asociada con proteínas invariables del complejo CD3 que intervienen en la transducción de señales. Los TCR se dividen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que si bien son similares desde el punto de vista estructural son distintas en su localización anatómica y, probablemente, en sus funciones. La fracción extracelular del TCR heterodimérico nativo $\alpha\beta$ consta de dos polipéptidos, cada uno de los cuales posee un dominio constante en la parte más cercana a la membrana celular (proximal) y un dominio variable en el extremo más alejado de la misma (distal). Cada uno de los dominios constantes y variables alberga un puente

disulfuro intracatenario. Los dominios variables contienen un bucle altamente polimórfico que es análogo a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) propias de los anticuerpos. El uso de la terapia génica con TCR permite solventar algunas trabas. Permite dotar a los linfocitos T del propio paciente de las especificidades deseadas, así como generar el número suficiente de ellos en un breve lapso de tiempo y evitar su agotamiento. El TCR se transduce en los linfocitos T de la memoria central o en los linfocitos T dotados de características pluri-potentes, con el fin de asegurar en lo posible una mayor persistencia o mejor función tras la transferencia. El propósito último es administrar los linfocitos T provistos de los TCR genomodificados a través de una infusión a los pacientes oncológicos que han quedado inmunodeprimidos (linfopénicos) a causa de la quimioterapia o la radioterapia, posibilitando así un injerto eficiente y al mismo tiempo anulando la depresión inmunitaria.

Si bien ha habido avances en el desarrollo de agentes 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 del COL6A3, los correspondientes constructos recombinantes de TCR, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras que se unen específicamente a uno o varios epítomos del COL6A3 dados a conocer, así como métodos para usar tales moléculas en el tratamiento contra el cáncer.

El objeto de la invención se resuelve en un primer aspecto con un constructo reconocedor de antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) 3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferentemente del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 3, 9, 15, 21, 27 y 33.

En otra forma de realización adicional o alternativa, el constructo reconocedor de antígeno puede comprender además una secuencia del dominio CDR1 y/o CDR2. Dentro del dominio variable, la CDR1 y la CDR2 radican en la región variable (V) de una cadena polipeptídica, y la CDR3 incluye algunas de la región V, todas de las regiones de diversidad (D) y de unión (J). La CDR3 es la más variable y es la principal CDR responsable de reconocer de manera específica y selectiva un antígeno. Las secuencias de CDR1 y CDR2 se pueden seleccionar de una secuencia CDR de un alelo humano de la cadena variable.

Los TCR heterodiméricos alfa-beta nativos poseen una cadena alfa y una cadena beta. Cada cadena comprende sendas regiones constante, de unión y variable, a las que normalmente se suma en la cadena beta una región de diversidad corta entre la región de unión y la variable, si bien dicha región de diversidad se considera a menudo parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de la complementariedad) intercaladas en una secuencia estructural, una de las cuales es la región hipervariable llamada CDR3. Existen varios tipos de regiones variables de la cadena alfa ($V\alpha$) y varios tipos de regiones variables de la cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su estructura, por las secuencias CDR1 y CDR2 y por una secuencia CDR3 parcialmente definida. En la nomenclatura IMGT, los tipos $V\alpha$ reciben un número único TRAV, mientras que los tipos $V\beta$ reciben un número único TRBV.

Así pues, en una forma de realización adicional o alternativa el constructo reconocedor de antígeno de la invención comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 en una combinación como la presentada más adelante en la Tabla 1 de la presente memoria, que muestra el correspondiente alelo de la cadena variable junto con la secuencia de la CDR3. Así pues, se prefieren constructos reconocedores de antígenos de la invención que comprendan como mínimo una, pero preferentemente las tres secuencias de CDR, es decir, CDR1, CDR2 y CDR3. Preferentemente, un constructo reconocedor de antígeno de la invención comprende los respectivos CDR1 a CDR3 de una región variable del TCR de la invención dada a conocer en la presente memoria.

A efectos de la presente memoria, el término «especificidad» o «especificidad antigénica» o «específico para» un antígeno dado, significa que el constructo reconocedor de antígeno se puede unir específicamente a dicho antígeno, preferentemente un antígeno de COL6A3, más preferentemente con una avidéz elevada, cuando dicho antígeno es presentado por moléculas del sistema HLA, preferentemente del alelo HLA-A2. Por ejemplo, se puede considerar que un TCR, en calidad de constructo reconocedor de antígeno, posee «especificidad antigénica» hacia los antígenos de COL6A3, si los linfocitos T que expresan ese TCR y entran en contacto con una molécula de HLA que les presenta el COL6A3 segregan como mínimo unos 200 pg/ml o más de interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) (p.ej. 250 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 700 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 2000 pg/ml o más, 2500 pg/ml o más, 5000 pg/ml o más) tras su cultivo simultáneo con células diana estimuladas con una baja concentración de un antígeno de COL6A3, como los antígenos y los epítomos de COL6A3 proporcionados más adelante en la presente memoria (p. ej., aprox. 10^{-11} mol/l, 10^{-10}

mol/l, 10^{-9} mol/l, 10^{-8} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l ó 10^{-5} mol/l). Otro criterio alternativo o adicional consiste en considerar un TCR como provisto de «especificidad antigénica» hacia COL6A3, si los linfocitos T que expresan ese TCR segregan como mínimo dos veces más IFN- γ que el nivel de fondo de IFN- γ resultante del cultivo simultáneo de linfocitos no transducidos con células diana estimuladas con una baja concentración de antígenos de COL6A3. Tal «especificidad» como la descrita se puede analizar, entre otros medios, con un ELISA.

En una forma de realización alternativa o adicional de la invención, el constructo reconocedor de antígeno se une selectivamente a un antígeno de COL6A3; preferiblemente el antígeno de COL6A3 es un epítipo proteico o un péptido provisto de una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID N.º 58 a 67, más preferentemente la SEQ ID N.º 58, o una variante de las mismas, consistiendo dicha variante en una delección, adición, inserción o sustitución de aminoácido de como máximo tres, preferentemente dos y más preferentemente aún un máximo de una posición de aminoácido.

El término «selectividad» o «reconocimiento y unión selectivas» se entiende que designa la facultad de un constructo reconocedor de antígeno, como un TCR o un anticuerpo, para reconocer selectivamente o unirse preferentemente a un único epítipo específico y que preferentemente muestra una reactividad cruzada nula o ínfima con otro epítipo. Preferentemente «selectividad» o «reconocimiento y unión selectivas» significa que el constructo reconocedor de antígeno (p. ej. un TCR) reconoce selectivamente o se une preferentemente a un único epítipo específico y preferentemente muestra una reactividad cruzada nula o ínfima con otro epítipo, en que dicho epítipo es único de una proteína, de tal modo que el constructo reconocedor de antígeno presenta una reactividad cruzada nula o ínfima con otro epítipo y otra proteína.

El constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención se selecciona preferentemente de un anticuerpo, un derivado o fragmento del mismo, o un receptor de linfocito T (TCR), o un derivado o fragmento del mismo. Un derivado o fragmento de anticuerpo o de TCR de la invención debe conservar preferentemente la capacidad para reconocer o unirse al antígeno de la molécula madre, en particular su especificidad y/o selectividad como se han explicado antes. Esa funcionalidad de unión se puede conservar mediante la presencia de una región CDR3 tal y como se define en la presente memoria.

En una forma de realización de la invención, los TCR de la invención son capaces de reconocer los antígenos de COL6A3 que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. «Presentados por el MHC de clase I», tal y como se emplea en la presente memoria, significa que el TCR desencadena una respuesta inmunitaria tras su unión a los antígenos de COL6A3 que le son presentados por una molécula del MHC de clase I. La molécula MHC de clase I puede ser cualquier molécula MHC de clase I conocida en la técnica, p. ej., moléculas HLA-A. En una forma de realización preferida de la invención, la molécula MHC de clase I es una molécula del HLA-A2.

La invención proporciona tanto un constructo reconocedor de antígeno monocatenario como constructos reconocedores bicatenarios.

La invención proporciona en concreto un TCR como constructo reconocedor de antígeno, o un fragmento o derivado del mismo. El TCR es preferentemente de origen humano, por lo cual se entiende como generado a partir de un locus de un TCR humano y que, por consiguiente, comprende secuencias de TCR humanas. Además, el TCR de la invención se puede caracterizar porque es de origen humano y reconoce específicamente un antígeno de COL6A3.

Otra forma de realización de la invención proporciona de forma adicional o alternativa el constructo reconocedor de antígeno antes descrito, que estimula una respuesta inmunitaria, y preferentemente dicha respuesta inmunitaria se caracteriza por un incremento de los niveles de interferón gamma (IFN- γ).

Los TCR de la invención se pueden proporcionar en forma de moléculas monocatenarias α o β , o γ y δ , o alternativamente como constructos bicatenarios compuestos por una cadena α y otra β , o por una cadena γ y otra δ .

El constructo reconocedor de antígeno de la invención puede comprender una cadena α o γ de TCR; y/o una cadena β o δ de TCR; la cadena α o γ del TCR comprende una CDR3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o el 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID N.º 3, 15 y 27, y/o la cadena β o δ del TCR comprende una CDR3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 9, 21 y 33.

Más preferentemente, en algunas formas de realización adicionales, en que la revelación se refiere a constructos reconocedores de antígeno que comprenden una cualquiera, dos o todas las regiones CDR1 a CDR3 de las cadenas de TCR descritas en la presente memoria (véase la Tabla 1), se pueden preferir constructos reconocedores de antígeno que comprendan la respectiva secuencia del CDR provista de tres, dos, y preferentemente un único residuo de aminoácido modificado. El residuo de aminoácido modificado se puede seleccionar entre los siguientes supuestos: una inserción, una delección o una sustitución de aminoácido. Más preferentemente aún es que los tres, los dos, o preferentemente el único residuo de aminoácido modificado sea el primero o el último residuo de aminoácido de la secuencia de la CDR respectiva. Si la modificación consiste en una sustitución, entonces en ciertas formas de realización es preferible que sea una sustitución de aminoácido conservadora.

Si el constructo reconocedor de antígeno de la invención está compuesto por al menos dos cadenas de aminoácidos, como un TCR bicatenario, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el constructo reconocedor de antígeno puede comprender en su primera cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 3, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 9; o en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 15, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 21; o bien en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 27, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 33. Cualquiera de los susodichos TCR bicatenarios, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son los TCR preferidos de la presente invención. En ciertas formas de realización, la CDR3 del TCR bicatenario de la invención puede estar mutada. Las mutaciones de las secuencias de CDR3 de las SEQ ID N.º 9 a 28 como las proporcionadas antes incluyen preferentemente una sustitución, delección, adición o inserción de un máximo de tres, preferentemente dos, y más preferentemente como máximo un solo residuo de aminoácido. En algunas formas de realización, la primera cadena polipeptídica puede ser una cadena α o γ de TCR, y la segunda cadena polipeptídica puede ser una cadena β o δ de TCR. Se prefiere la combinación de un TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

El TCR, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, está compuesto en ciertas formas de realización por una cadena α de TCR y otra cadena β de TCR, o bien por una cadena γ y otra δ .

Ese TCR bicatenario comprende regiones variables en cada una de sus cadenas, y tales regiones variables comprenden a su vez una secuencia CDR1, otra CDR2 y otra CDR3. Los TCR comprenden las secuencias CDR1 a CDR3 que forman parte de la secuencia de aminoácidos de cadena variable de la SEQ ID N.º 4 y la SEQ ID N.º 10 (R4P1D10), o la SEQ ID N.º 16 y la SEQ ID N.º 22 (R4P3F9), o la SEQ ID N.º 28 y la SEQ ID N.º 34 (R4P3H3).

Ciertas formas de realización de la invención se refieren a un TCR, o a un fragmento del mismo, compuesto por una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en que dicho TCR comprende las secuencias de región variable provistas como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferentemente del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las cadenas α y β acordes con las SEQ ID N.º 4 y 10 respectivamente, o 16 y 22 respectivamente, o 28 y 34 respectivamente.

Los TCR de la invención pueden comprender, además, una región constante derivada de cualquier especie adecuada, como es cualquier mamífero, p. ej., ser humano, rata, mono, conejo, asno o ratón. En una forma de realización de la invención, los TCR de la invención comprenden, además, una región constante humana. En ciertas formas de realización preferidas, la región constante del TCR de la invención puede ser levemente modificada, por ejemplo, con la introducción de secuencias heterólogas, preferentemente de secuencias de ratón, que pueden incrementar la estabilidad y la expresión del TCR.

Ciertas formas de realización de la invención se refieren a un TCR, o a un fragmento del mismo, compuesto por una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en que dicho TCR comprende la región constante provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferentemente del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las cadenas α y β conformes a las SEQ ID N.º 5 y 11 respectivamente, o 17 y 23 respectivamente, o 29 y 35 respectivamente.

La cadena α o γ del TCR de la invención puede comprender además una CDR1 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 1, 13 y 25, y/o una CDR2 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%,

80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 2, 14 y 26.

Según la invención, la cadena β o δ del TCR puede comprender, además, una CDR1 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 7, 19 y 31, y/o una CDR2 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 8, 20 y 32.

En otra forma de realización, el constructo reconocedor de antígeno puede comprender un fragmento de unión de un TCR, en el que dicho fragmento de unión comprende las CDR1 a CDR3, opcionalmente seleccionadas entre las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 1, 2, 3, ó 7, 8, 9 ó 13, 14, 15, ó 19, 20, 21, ó 25, 26, 27 ó 31, 32, 33.

En otras formas de realización de la invención el constructo reconocedor de antígeno que ha sido descrito antes en la presente memoria es un TCR, o un fragmento del mismo, compuesto por al menos una secuencia de la cadena α de TCR y una secuencia de cadena β de TCR, en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 1 a 3, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 7 a 9; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 13 a 15, y dicha secuencia de cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 19 a 21; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 25 a 27, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 31 a 33.

En otras formas de realización de la invención el constructo reconocedor de antígeno que ha sido descrito antes en la presente memoria es un TCR, o un fragmento del mismo, que comprende al menos una secuencia de la cadena α de TCR y una secuencia de cadena β de TCR, en

que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 4, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 10; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 16, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 22; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 28, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 34.

En otras formas de realización de la invención el constructo reconocedor de antígeno que ha sido descrito antes en la presente memoria es un TCR, o un fragmento del mismo, que además comprende una región constante de TCR provista como mínimo de una secuencia de identidad del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 5, 11, 17, 23, 29 y 35, preferentemente en que el TCR está compuesto de al menos una secuencia de cadena α de TCR y de una secuencia de cadena β de TCR, en que la secuencia de la cadena α de TCR comprende una región constante provista de al menos una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 5, 17 y 29.

Se dan a conocer asimismo constructos reconocedores de antígenos como los descritos antes en la presente memoria que comprenden una primera cadena de TCR provista de una secuencia de identidad de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 6, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 12. La invención también proporciona TCR que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 18, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 24. En otras formas de realización la invención proporciona constructos reconocedores de antígeno que son

TCR y que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 30, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 36.

A efectos de la presente memoria, el término «murino» o «humano», cuando se refiere a un constructo reconocedor de antígeno, o a un TCR, o a cualquier componente de un TCR descrito en la presente memoria (p. ej., región determinante de la complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena α y/o cadena β), designa un TCR o un componente del mismo, que procede de un locus de TCR de ratón o de ser humano sin reorganizar.

En una forma de realización de la invención se proporcionan TCR quiméricos, cuyas cadenas de TCR comprenden secuencias procedentes de varias especies. Preferentemente, un TCR de la invención puede comprender una cadena α que comprende una región variable humana procedente de una cadena α y, por ejemplo, una región constante murina procedente de una cadena α de TCR murino.

En una forma de realización, el TCR de la invención es un TCR humano que comprende regiones variables humanas acordes con las susodichas formas de realización así como regiones constantes humanas.

El TCR de la invención se puede proporcionar en forma de TCR monocatenario (TCRmc). Un TCRmc puede comprender un polipéptido procedente de una región variable de una primera cadena de TCR (p. ej., una cadena alfa) y un polipéptido procedente de una segunda cadena TCR entera (íntegra) (p. ej., una cadena beta), o viceversa. Asimismo, el TCRmc puede comprender opcionalmente uno o más conectores que unan los dos o más polipéptidos entre sí. El conector puede ser, por ejemplo, un péptido, que una entre sí dos cadenas sencillas, tal y como describe la presente memoria. También se puede proporcionar un TCRmc de la invención que esté fusionado con una citocina humana, como por ejemplo la IL-2, la IL-7 o la IL-15.

El constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención también se puede proporcionar con la forma de un complejo multimérico, que comprende como mínimo dos moléculas

TCRmc, donde cada una de esas moléculas de TCRmc están fusionadas con al menos una biotina, y en que dichas TCRmc están interconectadas por la interacción entre la biotina y la estreptoavidina con el fin de formar dicho complejo multimérico. La creación de TCR multiméricos también es posible con otras estrategias similares que figuran incluidas en la presente memoria. Asimismo se proporcionan complejos multiméricos de orden superior, que comprenden más de dos TCRmc de la invención.

A efectos de la presente invención, un TCR es una fracción provista de al menos un dominio variable de cadena alfa o beta del TCR y/o de cadena beta o delta del TCR. En general, comprenden tanto un dominio variable alfa de TCR como un dominio variable beta de TCR. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta$ o pueden tener un formato monocatenario. Para el uso en la terapia adoptiva, un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ podría, por ejemplo, ser transfectado en forma de cadenas enteras provistas tanto de dominios citoplasmáticos como transmembrana. Si conviniese, podría incorporarse un puente disulfuro entre residuos de los respectivos dominios constantes.

En una forma de realización preferida, el constructo reconocedor de antígeno es un TCR humano, o un fragmento o derivado del mismo. Un TCR humano o un fragmento o derivado del mismo es un TCR que comprende más del 50% de la secuencia de TCR humana correspondiente. Preferentemente, solo una pequeña parte de la secuencia del TCR es de origen artificial o deriva de otras especies. Sin embargo, es sabido que los TCR quiméricos, p. ej. aquellos que siendo de origen humano incorporan secuencias murinas en los dominios constantes, resultan ventajosos. Así pues, se prefieren especialmente los TCR acordes con la presente invención que contengan secuencias murinas en la parte extracelular de sus dominios constantes.

También se prefiere que el constructo reconocedor de antígeno de la invención sea capaz de reconocer su antígeno a través del sistema de antígenos leucocíticos humanos (HLA), preferiblemente presentados a través del alelo HLA-A02. El término «presentado por (o a través de) el sistema HLA» en el contexto de la presente invención significa que el constructo reconocedor de antígeno se une al antígeno solo en el caso de que el péptido antigénico sea presentado por dicho HLA.

El constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención induce en una forma de realización preferida una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria que se caracteriza por el incremento de los niveles de interferón gamma (IFN- γ).

La invención también proporciona un polipéptido que comprende una fracción funcional de cualquiera de los TCR (o de variantes funcionales del mismo) descritos en la presente memoria, por ejemplo, de cualquiera de los TCR seleccionados de R4P1D10, R4P3F9 y R4P3H3, que aparecen en el apartado de Ejemplos y en la Tabla 1. El término «polipéptido» tal y como se emplea en la presente memoria incluye oligopéptidos y se refiere a una monocadena de aminoácidos conectados por uno o más enlaces peptídicos. Con respecto a los polipéptidos de la invención, la fracción funcional puede ser cualquier fracción que comprenda aminoácidos contiguos del TCR (o de una variante funcional del mismo), del cual forma parte, siempre que la fracción funcional se una específicamente a un antígeno de COL6A3, preferentemente tal y como se indica en la Tabla 2 de la presente memoria, y los péptidos A1 a A9 (SEQ ID N.º 59 a 67). El término «fracción funcional» cuando se usa en referencia a un TCR (o a una variante funcional del mismo) se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR de la invención (o de una variante funcional del mismo) que conserva la actividad biológica del TCR (o de una variante funcional del mismo) y que forma parte del mismo (del TCR original o de la variante funcional original del mismo). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR (o de una variante funcional del mismo) que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno de COL6A3 (presentado por el HLA-A2), o de detectar, tratar o prevenir un cáncer, en un grado parecido, igual o superior al del TCR original (o al de una variante funcional del mismo). En referencia al TCR original (o a una variante funcional del mismo), la fracción funcional puede comprender, por ejemplo, alrededor de un 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más de las secuencias variables del TCR original (o de una variante funcional del mismo).

La fracción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi-terminal de la fracción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se hallan en la secuencia de aminoácidos propia del TCR original o de la variante funcional del mismo. Es conveniente que esos aminoácidos adicionales no interfieran con la función biológica de la fracción funcional, p. ej. su unión específica a antígenos de COL6A3 y/o con la capacidad para detectar, tratar o prevenir el cáncer, etc. Aún más conveniente es que los aminoácidos adicionales potencien la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR original o de la variante funcional del mismo.

El polipéptido puede comprender una fracción funcional derivada de una o de ambas cadenas α y β de los TCR de la invención o de las variantes funcionales de los mismos, de tal forma que la fracción funcional comprenda una o más de las CDR1, CDR2 y (preferentemente) CDR3 de la región o regiones variables de la cadena α y/o la cadena β de un TCR de la invención o de una variante funcional del mismo. En una forma de realización de la invención, el polipéptido puede comprender una fracción funcional que comprenda la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N.º 3, 9, 15, 21, 27 y 33 (CDR3 de las regiones variables del TCR de la invención), o una combinación de las mismas. En una forma de realización de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR de la invención o de una variante funcional del mismo que contenga una combinación de las regiones CDR indicadas arriba. A este respecto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID N.º 4, 10, 16, 22, 28 y 34 (las regiones variables de una cadena α o β del TCR de la invención).

En ciertos casos, el constructo de la invención puede comprender una o dos cadenas polipeptídicas que contengan una secuencia conforme con cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a 36 (secuencias CDR, regiones variables y constantes y secuencias enteras), o fragmentos funcionales de las mismas, y además contener otras secuencias de aminoácidos, como por ejemplo una secuencia de aminoácidos que codifique una inmunoglobulina o una fracción de la misma, en cuyo caso la proteína de la invención puede ser una proteína de fusión. A este respecto, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente memoria junto con al menos otro polipéptido más. El otro polipéptido puede concurrir como un polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede hacerlo como un polipéptido que se exprese en tándem junto con uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente memoria. El otro polipéptido puede incluir cualquier molécula peptídica o proteinácea, o una fracción de la misma, que incluya sin estar limitada a ella, una inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula del MHC, una molécula CD1, p. ej. CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

La proteína de fusión puede comprender una o más copias del polipéptido de la invención y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más copias del polipéptido de la invención y/o del otro polipéptido. Los métodos adecuados para fabricar proteínas de fusión son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, método recombinantes. En ciertas formas de realización de la invención, los TCR (y las

fracciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos), los polipéptidos, y las proteínas de la invención se pueden expresar como una sola proteína que comprenda un péptido conector (*linker*) que conecte la cadena α con la cadena β , y conecte la cadena γ con la cadena δ . A este respecto, los TCR (y las variantes funcionales y las fracciones funcionales de los mismos), los polipéptidos y las proteínas de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del TCR de la invención y pueden comprender además un péptido conector. El péptido conector puede facilitar ventajosamente la expresión de un TCR recombinante (incluidas las fracciones funcionales y las variantes funcionales del mismo), un polipéptido y/o una proteína en una célula hospedadora. El péptido conector puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. Las secuencias de conexión para los constructos de TCR monocatenarios son bien conocidas en la técnica. Tal constructo monocatenario puede comprender además una o dos secuencias de dominio constante. Una vez que la célula hospedadora exprese el constructo provisto de péptido conector, el péptido conector puede ser escindido, lo que dará como resultado la separación de las cadenas α y β o de las cadenas γ y δ .

Como ya se ha mencionado antes, la funcionalidad de unión del TCR de la invención se puede proporcionar incorporada en la estructura de un anticuerpo. El termino «anticuerpo» en sus diversas formas gramaticales se usa en la presente memoria para referirse a moléculas de inmunoglobulina y a fracciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno o un paratopo. Tales moléculas también se denominan «fragmentos de unión con el antígeno» de las moléculas de inmunoglobulina. La invención proporciona además un anticuerpo, o una fracción de unión con el antígeno del mismo, que se une específicamente a los antígenos descritos en la presente memoria. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que sea conocida en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, como IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. Y además puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo natural, p. ej. un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, como por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo genéticamente modificado, como por ejemplo un anticuerpo humanizado o uno quimérico. El anticuerpo puede aparecer en forma monomérica o polimérica.

La invención también proporciona fracciones de unión al antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria. La fracción de unión al antígeno puede ser cualquier fracción que posea como mínimo un sitio de unión con el antígeno, tales como Fab, F(ab')₂,

dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos. El fragmento de anticuerpo que es un fragmento monocatenario de región variable (sFv) consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo enlazado con un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo a través de un péptido sintético, que puede ser creado con técnicas de ADN recombinante ordinarias. De forma similar, es posible preparar fragmentos de región variable estabilizados con puentes disulfuro (dsFv) mediante técnicas de ADN recombinante que sirvan como fragmentos de anticuerpo de la invención; no obstante, los tipos de fragmentos de anticuerpo no se limitan a los citados, que se muestran a título de ejemplo. Asimismo, el anticuerpo, o la fracción de unión al antígeno del mismo, puede ser modificado para que contenga un marcador detectable, como por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (p. ej. isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante), y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro). En ciertos casos, la secuencia de la CDR3 del TCR puede ser ligeramente modificada, pero es preferible que lo sea como máximo en 3 residuos de aminoácidos, preferentemente solo en dos y, más preferentemente aún, en una sola posición de aminoácido, con respecto a las secuencias de la CDR3 expuestas en las SEQ ID N.º 3, 9, 15, 21, 27 y 33. Preferentemente, los anticuerpos comprenderán la CDR3, preferentemente todas las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la combinación, tal y como aparece indicado para el TCR de la invención en la Tabla 1.

Los métodos adecuados para fabricar anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos ordinarios para la fabricación con hibridomas aparecen descritos en Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), en Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y en C.A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 8 Ed., Garland Publishing, New York, NY (2011)), entre otras referencias. Existen además otros métodos alternativos, como los basados en la transformación de hibridomas con el EBV (Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2), 361-67 (1984), y Roder et al, *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y los sistemas de expresión mediante vectores bacteriófagos (véase por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)) que son conocidos en la técnica. Además, se describen métodos para producir anticuerpos en animales en las patentes de EE.UU. 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, así como en la publicación de solicitud de patente en EE.UU. N.º 2002/0197266, entre otras referencias.

Ciertas formas de realización de la invención también conciernen a TCR, o a fragmentos funcionales y polipéptidos de los mismos, que son TCR solubles. A efectos de la presente memoria,

el término «receptor de linfocito T soluble» se refiere a variantes truncadas heterodiméricas de TCR nativos, que comprenden fracciones extracelulares de la cadena α y de la cadena β del TCR que permanecen unidas por un puente disulfuro, pero que carecen de los dominios transmembrana y citosólicos de la proteína nativa. Los términos «secuencia de la cadena α del receptor de linfocito T soluble» y «secuencia de la cadena β del receptor de linfocito T soluble» se refieren a secuencias de las cadenas α y β del TCR que carecen de los dominios transmembrana y citosólico. La secuencia (de aminoácidos o de ácidos nucleicos) de las cadenas α y β del TCR soluble pueden ser idénticas a las secuencias correspondientes de un TCR nativo o pueden comprender secuencias de las cadenas α y β del TCR soluble que sean variantes, en comparación con las secuencias del correspondiente TCR nativo. A efectos de la presente memoria, el término «receptor de linfocito T soluble» abarca los TCR solubles provistos de secuencias variantes y no variantes de las cadenas α y β de TCR soluble. Las variaciones pueden radicar en las regiones variables o constantes de las secuencias de las cadenas α y β de TCR soluble y pueden incluir, sin ánimo de limitación, mutaciones por delección, inserción o sustitución de aminoácidos, así como cambios en la secuencia de ácidos nucleicos que no alteren la secuencia de aminoácidos. Los TCR solubles de la invención conservarán en cualquier caso la funcionalidad de unión de las moléculas originales de las cuales deriven.

El susodicho problema se resuelve además mediante un ácido nucleico que codifique un constructo reconocedor de antígeno de la invención, o cualquiera de los susodichos constructos proteicos o polipeptídicos. El ácido nucleico tendrá preferentemente: (a) una hebra que codifique un constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención; (b) una hebra complementaria de la hebra (a); o (c) una hebra que hibride en condiciones rigurosas (astringentes) con una molécula descrita en (a) o (b). Las condiciones rigurosas son conocidas por las personas versadas en la materia, concretamente se pueden consultar en Sambrook et al, "Molecular Cloning". Además de lo anterior, el ácido nucleico puede contener opcionalmente otras secuencias que sean necesarias para expresar la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente a la proteína, específicamente para su expresión en una célula de mamífero o humana. El ácido nucleico usado puede estar contenido en un vector adecuado para posibilitar la expresión en la célula en cuestión de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al péptido. No obstante, los ácidos nucleicos también se pueden usar para transformar una célula presentadora de antígeno, que podría no ser una célula presentadora de antígeno clásica, como son las células dendríticas, de tal modo que ella misma produjera las proteínas correspondientes en su superficie celular.

A efectos de la presente memoria, «ácido nucleico» incluye «polinucleótido», «oligonucleótido» y «molécula de ácido nucleico», y en general designa un polímero de ADN o de ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, que puede contener un enlace entre nucleótidos naturales, no naturales o alterados, como un enlace fosforamidado o fosforotioato, en lugar del enlace fosfodiéster que se halla entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado.

Preferentemente, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. A efectos de la presente memoria, el término «recombinante» se refiere a: (I) moléculas que son construidas fuera de células vivas mediante la unión de segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos con moléculas de ácidos nucleicos que se pueden replicar en una célula viva; o (II) moléculas que son el resultado de la replicación de las descritas en el precedente punto (I). A efectos de la presente memoria, la replicación puede ser una replicación en condiciones *in vitro* o en condiciones *in vivo*. El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas, o fracciones funcionales o variantes funcionales de los mismos que se describen en la presente memoria.

Además, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico acorde con la invención tal y como se ha descrito antes. Es conveniente que el vector sea un vector de expresión o un vector de expresión recombinante. En el contexto de la presente invención, el término «vector de expresión recombinante» se refiere a un constructo de ácido nucleico que posibilita la expresión de un ARNm, una proteína o un polipéptido en el seno de una célula hospedadora adecuada. El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante, y se puede usar para transformar o transfectar cualquier hospedador adecuado. Los vectores aptos incluyen los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o bien para ambas, tales como plásmidos y virus. Ejemplos de vectores de expresión animales son pEUK-Cl, pMAM y pMAMneo. Preferentemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo un vector retroviral. El vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción, que son específicas para cada tipo de célula hospedadora (bacteria, hongo, planta o animal, entre otras), en la cual se va a introducir el vector con el propósito de que tenga lugar la expresión del ácido nucleico de la invención. Asimismo, el vector de la invención puede incluir uno o varios genes marcadores, que permitan la selección de las células hospedadoras

transformadas o transfectadas. El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor normativo o nativo enlazado funcionalmente con la secuencia de nucleótidos que codifica los constructos de la invención, o con la secuencia de nucleótidos que es complementaria o que hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica los constructos de la invención. Los promotores susceptibles de selección incluyen, entre otros tipos, promotores específicos del desarrollo o de tejido, inducibles, débiles o potentes. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden ser diseñados para generar una expresión transitoria o una expresión estable, o ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden diseñar para generar una expresión constitutiva o bien inducible.

La invención también atañe a una célula hospedadora que comprende un constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención. En concreto, la célula hospedadora de la invención comprende un ácido nucleico, o un vector como el descrito antes en la presente memoria. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, vegetal, animal, fúngica o algal, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacteriana o protozoaria. La célula hospedadora puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, como por ejemplo un ser humano. La célula hospedadora puede ser una célula adherida o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. A los efectos de producir un TCR, un polipéptido o una proteína que sean recombinantes, es preferible que la célula hospedadora sea una célula de mamífero. Más preferentemente aún, es conveniente que la célula hospedadora sea una célula humana. Si bien la célula hospedadora puede ser una célula de cualquier tipo, procedente de cualquier tipo de tejido y perteneciente a cualquier estadio del desarrollo, es preferible que sea un leucocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononucleada de sangre periférica (PBMC). Más preferentemente aún es que la célula hospedadora sea un linfocito T. El linfocito T puede ser cualquier linfocito T, como un linfocito T cultivado, p. ej. un linfocito T primario, o un linfocito T procedente de una estirpe cultivada de linfocitos T, como p. ej. Jurkat, SupT1, etc., o bien un linfocito T obtenido de un mamífero, preferentemente un linfocito T o un precursor de linfocito T extraído a un paciente humano. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T puede proceder de numerosas fuentes, tales como sangre, médula ósea, ganglio linfático, timo u otros tejidos o líquidos corporales, entre otras. Los linfocitos T también se pueden enriquecer o purificar. Preferentemente, el linfocito T es un linfocito T humano. Más preferentemente aún, el linfocito T es un linfocito T aislado de un humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede pertenecer a cualquier estadio del desarrollo,

incluidos entre otros, un linfocito T CD4-positivo y/o CD8-positivo, linfocitos T cooperadores CD4-positivos, como p. ej. linfocitos Th1 y Th2, linfocitos T CD8-positivos (p. ej. linfocitos T citotóxicos), células infiltradas en tumores (TIL), linfocitos T de memoria, linfocitos T vírgenes, y similares. Preferentemente, el linfocito T es un linfocito T CD8-positivo o un linfocito T CD4-positivo.

Preferentemente, la célula hospedadora de la invención es un linfocito, preferiblemente un linfocito T, como un linfocito T CD4-positivo o un linfocito T CD8-positivo. Aún más preferente, la célula hospedadora es un linfocito T oncorreactivo que actúa específicamente contra las células tumorales que expresan COL6A3.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a los constructos reconocedores de antígeno, los ácidos nucleicos, los vectores, las composiciones farmacéuticas y/o la célula hospedadora que se exponen en la presente memoria destinados al uso en medicina. En una forma de realización preferida, el uso en medicina incluye el uso para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad tumoral, como una enfermedad tumoral benigna o maligna. La enfermedad tumoral es, por ejemplo, una enfermedad tumoral que se caracteriza por la expresión de COL6A3, en una célula cancerosa o tumoral de dicha enfermedad.

Con respecto a las susodichas aplicaciones médicas de los constructos reconocedores de antígeno y los otros materiales derivados de los mismos, el cáncer susceptible de diagnóstico y/o tratamiento puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de los siguientes: cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer del ano, del canal anal o anorrectal, cáncer ocular, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de la nariz, la cavidad nasal o del oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de rinofaringe, linfoma no hodgkiniano, cáncer bucofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de partes blandas, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de uréter y cáncer de

vejiga urinaria. Tipos de cáncer preferidos son el cáncer de cuello uterino, bucofaríngeo, ano, canal anal, anorrectal, vagina, vulva o pene. Un cáncer especialmente preferido es el cáncer positivo para COL6A3, incluido el cáncer gástrico y gastrointestinal.

Los constructos, proteínas, TCR, anticuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención están destinados en particular para el uso en inmunoterapia, preferentemente en la terapia adoptiva de linfocitos T. La administración de los compuestos de la invención puede, por ejemplo, implicar la infusión de los linfocitos T de la invención en el paciente en cuestión. Preferiblemente, tales linfocitos T son linfocitos T autólogos del paciente que en condiciones *in vitro* se transducen con un ácido nucleico o con un constructo reconocedor de antígeno de la presente invención.

WO 2016/011210 da a conocer células genéticamente modificadas destinadas a tratamientos adoptivos, que consisten en células NK y en linfocitos T, así como composiciones que contienen dichas células y métodos para su administración a individuos. Las células contienen receptores de antígeno genéticamente modificados para que se unan específicamente a antígenos, tales como receptores de antígeno quiméricos (CAR) o receptores coestimuladores.

El objetivo de la invención también se resuelve con un método de fabricación de una estirpe celular que expresa el constructo reconocedor de antígeno específico del COL6A3, el cual comprende:

- a. Proporcionar una célula hospedadora adecuada
- b. Proporcionar un constructo genético que comprende una secuencia codificante que codifica un constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención dada a conocer en la presente memoria
- c. Introducir en la citada célula hospedadora adecuada el citado constructo genético, y
- d. La expresión del citado constructo genético por la citada célula hospedadora adecuada.

El método puede comprender, además, un paso de presentación del citado constructo reconocedor de antígeno en la superficie de la citada célula hospedadora adecuada.

En otras formas de realización preferidas, el constructo genético es un constructo de expresión que comprende una secuencia promotora enlazada funcionalmente con dicha secuencia codificante.

Preferentemente, dicho constructo reconocedor de antígeno procede de un mamífero, y preferiblemente es de origen humano. La célula hospedadora adecuada que se prefiere para el uso en el método de la invención es una célula de mamífero, como una célula humana, en particular un linfocito T humano. Los linfocitos T para el uso en la invención ya han sido descritos pormenorizadamente en la presente memoria.

La invención también abarca formas de realización en las que dicho constructo reconocedor antígeno es un TCR modificado, y en la que dicha modificación consiste en la adición de dominios funcionales, como un marcador o un principio activo terapéutico. Asimismo, abarca TCR provistos de dominios alternativos, como un dominio de anclaje a membrana alternativo en lugar de la región transmembrana endógena.

Es conveniente que el sistema de transfección destinado a introducir el constructo genético en la citada célula hospedadora adecuada sea un sistema basado en un vector retroviral. Tales sistemas son bien conocidos por las personas versadas en la materia.

En una de sus formas de realización, la presente invención también comprende una etapa adicional del método que consiste en el aislamiento y la purificación del constructo reconocedor de antígeno a partir de la célula y, opcionalmente, en la reconstitución de los fragmentos traducidos de dicho constructo en un linfocito T.

En un aspecto alternativo de la invención, se provee un linfocito T obtenido o que puede ser obtenido mediante un método para la producción de un receptor de linfocito T (TCR), que es específico para células tumorales y que presenta una avidéz elevada, tal y como se ha descrito antes en la presente memoria. Tal linfocito T depende de la célula hospedadora usada en el método de la invención, por ejemplo, un linfocito T humano o no humano, pero preferentemente un TCR humano.

Los TCR, polipéptidos, proteínas (incluidas las variantes funcionales de todos ellos), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas) y los anticuerpos (incluidas las fracciones de unión al antígeno de los mismos) que forman parte de la presente invención se pueden aislar y/o purificar. A efectos de la presente memoria, el término «aislado» significa que ha sido sacado de su entorno natural.

Tal y como se emplea en la presente memoria, el término «purificado» significa que ha ganado en pureza, entendida la «pureza» como un término relativo y no necesariamente interpretable como una pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser como mínimo de en torno al 50% o puede ser superior al 60%, 70%, 80%, 90% o 95%, o bien ser del 100%.

Los constructos reconocedores de antígeno, los TCR, polipéptidos, proteínas (incluidas las variantes funcionales de todos ellos), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas) y los anticuerpos (incluidos las fracciones de unión al antígeno de los mismos) que forman parte de la presente invención serán designados todos ellos de manera colectiva como «materiales del TCR de la invención» de aquí en adelante y podrán ser formulados en una composición, como una composición farmacéutica. A este respecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los constructos reconocedores de antígeno, los TCR, polipéptidos, proteínas fracciones funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas) y los anticuerpos (incluidos las fracciones de unión al antígeno de los mismos) descritos en la presente memoria, así como un vehículo, excipiente y/o estabilizante aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen cualesquiera de los materiales de TCR de la invención pueden comprender más de un material de TCR de la invención, como por ejemplo, un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más TCR distintos (incluidas las fracciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos). Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR de la invención en combinación con otros medicamentos o principios activos farmacéuticos, como quimioterápicos, p. ej. asparraginas, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. Preferentemente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el vehículo puede ser cualquiera de los usados habitualmente para el material de TCR de la presente invención en consideración. Tales vehículos farmacéuticos son bien conocidos por las personas versadas en la materia y están públicamente disponibles. Es preferible que el vehículo farmacéutico no cause efectos secundarios perjudiciales ni toxicidad si se emplea siguiendo las condiciones de uso pertinentes.

Así pues, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los productos de la invención y de materiales de TCR de la invención que se describen en la

presente memoria, en concreto cualesquiera proteínas, ácidos nucleicos o células hospedadoras. En una forma de realización preferida la composición farmacéutica está destinada a servir como inmunoterapia, preferentemente la terapia adoptiva con células.

Preferentemente, el material de TCR de la invención se administra mediante inyección, por ejemplo intravenosa. Cuando el material de TCR de la invención sea una célula hospedadora que exprese el TCR de la invención (o una variante funcional del mismo), el vehículo farmacéutico para las células que se administrarán mediante inyección puede incluir cualquier vehículo isotónico como, por ejemplo, solución salina normal (aprox. 0,90% p/v de NaCl en agua, aprox. 300 mOsm/l de NaCl en agua, o aprox. 9,0 g de NaCl por litro de agua), solución de electrolitos NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL, EE.UU.), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL, EE.UU.), o una solución de dextrosa de aprox. el 5% en agua, o solución de lactato sódico compuesta (Ringer). En una forma de realización, el vehículo farmacéutico se complementa con albúmina de suero humana.

A efectos de la invención, la cantidad o la dosis del material de TCR de la invención (p. ej. el número de células cuando el material de TCR de la invención sea una o más células) que se ha de administrar debe ser la suficiente para influir, p. ej. para generar una respuesta preventiva o terapéutica, en el sujeto o en el animal durante un plazo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de TCR de la invención debe bastar para unirse a un antígeno tumoral, o para detectar, tratar o prevenir el cáncer en un período comprendido aproximadamente entre las 2 horas o más, p. ej. 12 o 24 horas o más, desde el momento de la administración. En ciertas formas de realización, el período de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis vendrá determinada por la eficacia del material de TCR de la invención en particular y del estado del animal o de la persona que va a ser tratada, así como de su peso corporal.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la invención, los TCR (incluidas las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras o poblaciones de células se puedan usar en métodos para tratar o prevenir el cáncer, o los estados precancerosos positivos para COL6A3. Se cree que los TCR de la invención (y las variantes funcionales de los mismos) se unen específicamente al antígeno de COL6A3, de tal modo que cuando el TCR (o el polipéptido o la proteína de la invención relacionados y las variantes funcionales de los mismos) se expresa en una célula, es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria contra una célula diana que expresa

los antígenos de COL6A3 de la invención. A este respecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad, en particular el cáncer, en un mamífero, el cual comprende la administración al mamífero de cualquiera de las composiciones farmacéuticas, constructos reconocedores de antígeno, en particular los TCR (y las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinantes que comprende una secuencia de nucleótidos que codifique alguno de los TCR (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad en el mamífero, siendo dicha enfermedad un cáncer, preferentemente un cáncer positivo para COL6A3.

Algunos ejemplos de vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico o de diluyentes útiles para la presente invención son estabilizantes como SPGA, carbohidratos (sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa o dextrano, entre otros), proteínas como albúmina o caseína, agentes portadores de proteínas como suero bovino o leche descremada y tampones (tampón fosfato, por ejemplo).

A efectos de la presente memoria, los términos «tratar» y «prevenir» así como las palabras derivadas de los mismos, no implican necesariamente el tratamiento o la prevención al 100% o en términos absolutos. Más bien existen diversos grados de tratamiento o de prevención de los que cualquier persona versada en la materia reconocerá como dotados de un posible efecto terapéutico o benéfico. A este respecto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier grado de tratamiento o de prevención de una enfermedad en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método de la invención pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más enfermedades o síntomas de la enfermedad, p. ej. el cáncer, que está siendo tratada o prevenida. Por ejemplo, el tratamiento o la prevención pueden incluir la promoción de la regresión de un tumor. Asimismo, a los efectos de la presente memoria, «prevención» puede abarcar el retraso en la aparición de la enfermedad, o de un síntoma o trastorno de la misma.

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 constructo reconocedor de antígeno de la presente invención 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 constructo reconocedor de antígeno de la presente invención 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 constructo reconocedor de antígeno de la presente descripción
- b) Detección de la unión del constructo reconocedor de antígeno 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*.

Asimismo se proporciona un método para detectar la presencia de una enfermedad en un mamífero. El método comprende: (I) La puesta en contacto de una muestra que comprenda una o más células del mamífero con cualquiera de los TCR (y variantes funcionales de los mismo), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos

que forman parte de la invención, o bien de las composiciones farmacéuticas descritas aquí, de tal modo que formen un complejo, y la detección de este complejo, siendo su detección indicadora de la presencia de la enfermedad en el mamífero, enfermedad que sería cáncer, y más en concreto una neoplasia maligna positiva para COL6A3.

Con respecto al método de la invención para detectar una enfermedad en un mamífero, la muestra de células puede ser una muestra que contenga células enteras, lisados de las mismas, o una fracción de las células enteras o de los lisados, como p. ej. una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción consistente en proteínas enteras, o una fracción consistente en ácidos nucleicos.

A efectos del método de detección de la invención, el contacto puede tener lugar en condiciones *in vitro* o en condiciones *in vivo* en lo que concierne al mamífero. Preferentemente, la puesta en contacto será en condiciones *in vitro*.

Asimismo, la detección del complejo puede darse a través diversos modos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los constructos reconocedores de antígeno (y las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células o anticuerpos o TCR, o fracciones de unión al antígeno de los mismos que forman parte de la invención y que se describen en la presente memoria, pueden ser marcados con un marcaje detectable como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína (FOTC), ficoeritrina (PE), etc.), una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, etc.), y partículas elementales (partículas de oro, etc.).

A efectos de los métodos de la invención, en los que se administren células hospedadoras o poblaciones de células, las células pueden ser alogénicas o autólogas del mamífero en cuestión. Preferentemente, las células serán autólogas del mamífero.

Con respecto a las susodichas aplicaciones médicas del material de TCR de la invención, el cáncer susceptible de diagnóstico y/o de tratamiento puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de los siguientes: cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer del ano, del canal anal o anorrectal, cáncer ocular, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de la nariz, la cavidad nasal o el oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica,

cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer rinofaríngeo, linfoma no hodgkiniano, cáncer bucofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de partes blandas, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. Tipos de cáncer preferidos son el cáncer de cuello uterino, bucofaríngeo, ano, canal anal, anorrectal, vagina, vulva o pene. Un tipo de cáncer especialmente preferido es el cáncer positivo para COL6A3, como el cáncer gástrico o gastrointestinal.

En general, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto aquejado de un tumor o enfermedad tumoral que comprende la administración de los constructos reconocedores de antígeno, ácidos nucleicos, vectores, composiciones farmacéuticas y/o célula hospedadora que la presente invención da a conocer. Preferentemente el sujeto es un sujeto que precisa un tratamiento de esa naturaleza. En las formas de realización preferida el sujeto es un mamífero, preferentemente un paciente humano, que está aquejado por un tumor o enfermedad tumoral, que es positiva para COL6A3.

A continuación se pasará a describir con más detalle la presente invención mediante una serie de ejemplos en los que se aludirá a figuras y secuencias adjuntas que describen las formas de realización preferidas de los mismos, sin que con ello se pretenda limitar el alcance de la invención. A efectos de la presente invención, todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su integridad. En las figuras y secuencias:

Figura 1: Secreción de IFN- γ (eje izquierda) y tinción con tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002 (eje derecho) de linfocitos T CD8⁺ primarios humanos procedentes de un donante que han sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de la cadena alfa y la cadena beta del TCR R4P1D10 (Tabla 1), respectivamente, tras la incubación conjunta con células diana K562-A2 (véase Hirano N. et al; Blood. 2006 Feb 15;107(4):1528-36) cargadas con el péptido COL6A3-

002 (SEQ ID N.º 58), diversas variantes de COL6A3-002 con sustitución de alanina o glicina en las posiciones 1 a 9 (SEQ ID N.º 59 a 67), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 68).

Figura 2: Secreción de IFN- γ (eje izquierda) y tinción con tetrameros HLA-A*02/COL6A3-002 (eje derecho) de linfocitos T CD8⁺ primarios humanos procedentes de un donante que han sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de la cadena alfa y la cadena beta del TCR R4P1D10 (Tabla 1), respectivamente, tras la incubación conjunta con células diana K562-A2 cargadas con el péptido COL6A3-002 (SEQ ID N.º 58), con los péptidos homólogos pero no relacionados AGRN-001, CLASP-001, COL6A1-001, COL6A2-001, COL6A3-006, COL6A3-008, COL6A3-014, VWA2-001 y VWF-001 (SEQ ID N.º 49 a 57), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 68). Como control se emplearon linfocitos T CD8⁺ sometidos únicamente a electroporación (Solo E; *E only*).

Figura 3: Tinción con tetrameros HLA-A*02/COL6A3-002 y con tetrameros HLA-A*02/NYESO1-001, respectivamente, de células J.RT3-T3.5 que han sido sometidas a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P1D10 o del TCR 1G4 de control que es específico para NYESO1-001 (Tabla 1). Como control se emplearon células J.RT3-T3.5 sometidas a una electroporación ficticia.

Figura 4: Tinción con tetrameros HLA-A*02/COL6A3-002 y con tetrameros HLA-A*02/NYESO1-001, respectivamente, de células SUP-T1 que han sido sometidas a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P1D10 o del TCR 1G4 de control que es específico para NYESO1-001 (Tabla 1). Como control se emplearon células SUP-T1 sometidas a una electroporación ficticia.

Figura 5: Tinción con tetrameros HLA-A*02/COL6A3-002 y con tetrameros HLA-A*02/NYESO1-001, respectivamente, de linfocitos T CD8⁺ primarios humanos procedentes de un donante que han sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P1D10 o del TCR 1G4 de

control que es específico para NYESO1-001 (Tabla 1). Como control se emplearon linfocitos T CD8+ sometidos a una electroporación ficticia.

Figura 6: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ primarios humanos procedentes de un donante que han sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P3F9 (Tabla 1), respectivamente, tras la incubación conjunta con células diana K562-A2 cargadas con el péptido COL6A3-002 (SEQ ID N.º 58), con diversas variantes de COL6A3-002 con sustitución de alanina o glicina en las posiciones 1 a 9 (SEQ ID N.º 59 a 67), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 68).

Figura 7: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ primarios humanos (eje izquierda) procedentes de un donante que han sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de la cadena alfa y la cadena beta del TCR R4P3F9 (Tabla 1), respectivamente, tras la incubación conjunta con células diana K562-A2 cargadas con el péptido COL6A3-002 (SEQ ID N.º 58), con los péptidos homólogos pero no relacionados AGRN-001, CLASP-001, COL6A1-001, COL6A2-001, COL6A3-006, COL6A3-008, COL6A3-014, VWA2-001 y VWF-001 (SEQ ID N.º 49 a 57), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 68). Como control se emplearon linfocitos T CD8+ sometidos únicamente a electroporación (Solo E; *E only*).

Figura 8: Tinción con tetrameros HLA-A*02/COL6A3-002 y con tetrameros HLA-A*02/NYESO1-001, respectivamente, de células J.RT3-T3.5 que han sido sometidas a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P3F9 o del TCR 1G4 de control que es específico para NYESO1-001 (Tabla 1). Como control se emplearon células J.RT3-T3.5 sometidas a una electroporación ficticia.

Figura 9: Tinción con tetrameros HLA-A*02/COL6A3-002 y con tetrameros HLA-A*02/NYESO1-001, respectivamente, de células SUP-T1 sometidas a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P3F9 o del TCR 1G4 de control que es específico para NYESO1-001 (Tabla 1). Como control se emplearon células SUP-T1 sometidas a una electroporación ficticia.

Figura 10: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ primarios humanos procedentes de un donante que han sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P3H3 (Tabla 1), respectivamente, tras la incubación conjunta con células diana K562-A2 cargadas con el péptido COL6A3-002 (SEQ ID N.º 58), con diversas variantes de COL6A3-002 con sustitución de alanina o glicina en las posiciones 1 a 9 (SEQ ID N.º 59 a 67), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 68).

Figura 11: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ primarios humanos (eje izquierda) procedentes de un donante que han sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de la cadena alfa y la cadena beta del TCR R4P3H3 (Tabla 1), respectivamente, tras la incubación conjunta con células diana K562-A2 cargadas con el péptido COL6A3-002 (SEQ ID N.º 58), con los péptidos homólogos pero no relacionados AGRN-001, CLASP-001, COL6A1-001, COL6A2-001, COL6A3-006, COL6A3-008, COL6A3-014, VWA2-001 y VWF-001 (SEQ ID N.º 49 a 57), o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 68). Como control se emplearon linfocitos T CD8⁺ sometidos únicamente a electroporación (Solo E; *E only*).

Figura 12: Tinción con tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002 y con tetrámeros HLA-A*02/NYESO1-001, respectivamente, de células SUP-T1 sometidas a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R4P3H3 o del TCR 1G4 de control que es específico para NYESO1-001 (Tabla 1). Como control se emplearon células SUP-T1 sometidas a una electroporación ficticia.

Tabla 1: Secuencias de los TCR de la invención

SEQ ID N.º	TCR	Cadena	Región	Secuencia
1	R4P1D10	alfa	CDR1	DRGSQS
2	R4P1D10	alfa	CDR2	IY
3	R4P1D10	alfa	CDR3	CAVNFHDKIIF
4	R4P1D10	alfa	Dominio variable	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIIRDSQ PSDSATYLCAVN

5	R4P1D10	alfa	Dominio constante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK SFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
6	R4P1D10	alfa	Entera	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ PSDSATYLCVNFHDKIIFGKGTRLH ILPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
7	R4P1D10	beta	CDR1	SGDLS
8	R4P1D10	beta	CDR2	YYNGEE
9	R4P1D10	beta	CDR3	CASSVASAYGYTF
10	R4P1D10	beta	Dominio variable	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERA KGNILERFSAQQFPLHSELNLSSLE LGDSALYFCASSV
11	R4P1D10	beta	Dominio constante	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKR KDF
12	R4P1D10	beta	Entero	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERA KGNILERFSAQQFPLHSELNLSSLE LGDSALYFCASSVASAYGYTFGSGT RLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW VWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFR RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMM AMVKRKDF
13	R4P3F9	alfa	CDR1	DRGSQS
14	R4P3F9	alfa	CDR2	IY
15	R4P3F9	alfa	CDR3	CAAYSGAGSYQLTF

16	R4P3F9	alfa	Dominio variable	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ PSDSATYLCA
17	R4P3F9	alfa	Dominio cons- tante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSVDYITDKTVLD MRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK SFETDTNLFQNL SVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
18	R4P3F9	alfa	Entero	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ PSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKG TKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDYIT DKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNK DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD VKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRI LLKVAGFNLLMTLRLWSS
19	R4P3F9	beta	CDR1	SGDLS
20	R4P3F9	beta	CDR2	YYNGEE
21	R4P3F9	beta	CDR3	CASSVESSYGYTF
22	R4P3F9	beta	Dominio variable	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIHYNGEERA KGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLE LGDSALYFCASSV
23	R4P3F9	beta	Dominio cons- tante	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDF
24	R4P3F9	beta	Entero	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERA KGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLE LGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTR LTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFFPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSA

				TILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF
25	R4P3H3	alfa	CDR1	DRGSQS
26	R4P3H3	alfa	CDR2	IY
27	R4P3H3	alfa	CDR3	CAVKAGNQFYF
28	R4P3H3	alfa	Dominio variable	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ PSDSATYLCAY
29	R4P3H3	alfa	Dominio cons- tante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSA VAWSNKSDFA CAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK SFETDTNLFQNL SVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
30	R4P3H3	alfa	Entero	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ PSDSATYLCAYKAGNQFYFGTGTSL TVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
31	R4P3H3	beta	CDR1	SGHVS
32	R4P3H3	beta	CDR2	FQNEAQ
33	R4P3H3	beta	CDR3	CASSLLTSGGDNEQFF
34	R4P3H3	beta	Dominio variable	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVS QSPRYKVA KRQDVALRCDPISGHV SLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQL DKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQR TQQEDSAVYLCASSL
35	R4P3H3	beta	Dominio cons- tante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRK DSRG
36	R4P3H3	beta	Entero	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVS QSPRYKVA KRQDVALRCDPISGHV SLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQL DKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQR TQQEDSAVYLCASSLLTSGGDNEQF FGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP

				SEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVE LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSA VLMAMVKRKDSRG
37	1G4	alfa	CDR1	DSAIYN
38	1G4	alfa	CDR2	IQS
39	1G4	alfa	CDR3	CAVRPTSGGSYIPTF
40	1G4	alfa	Dominio variable	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEV IPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQ SGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGD SATYLC AVR
41	1G4	alfa	Dominio cons- tante	YIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEK SFETDTNLFQNL SVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
42	1G4	alfa	Entero	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEV IPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQ SGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGD SATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKL VEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
43	1G4	beta	CDR1	MNHEY
44	1G4	beta	CDR2	SVGAGI
45	1G4	beta	CDR3	CASSYVGNTGELFF
46	1G4	beta	Dominio variable	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQ TPKFQVLKTGQSM TLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGI TDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLS AAPSQTSVYFCASSY
47	1G4	beta	Dominio cons- tante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYDPDHVELSWWWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSAVLMAMVKRK DSRG

48	1G4	beta	Entero	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQ TPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGI TDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLS AAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFG EGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLV MAMVKRKDSRG
----	-----	------	--------	---

Tabla 2:Secuencias de péptidos de la invención

Código del péptido	Secuencia	SEQ ID N.º
AGRN-001	ALLDGRVQL	49
CLASP1-001	RLLDGAFKL	50
COL6A1-001	ILLDGSASV	51
COL6A2-001	FLLDGSERL	52
COL6A3-006	FLFDGSANLV	53
COL6A3-008	FLFDGSANL	54
COL6A3-014	FLLDGSEGV	55
VWA2-001	FLLDGSNSV	56
VWF-001	FLLDGSSRL	57
COL6A3-002	FLLDGSANV	58
A1	ALLDGSANV	59
A2	FALDGSANV	60
A3	FLADGSANV	61
A4	FLLAGSANV	62
A5	FLLDASANV	63
A6	FLLDGAANV	64
A7	FLLDGSGNV	65
A8	FLLDGSAAV	66
A9	FLLDGSAVA	67
NYESO1-001	SLLMWITQV	68

EJEMPLOS

En un aspecto, la utilización de las condiciones alorreactivas permite eludir la autotolerancia y obtener linfocitos T provistos de elevada avidéz en comparación con los linfocitos T derivados de condiciones autólogas, esto es, de los propios pacientes. Ejemplos de tales condiciones incluyen la generación en condiciones *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 (Stanislawskiet al. 2001; Li et al. 2010), que se incorporan íntegramente como referencia.

Para aislar los linfocitos T provistos de alta avidéz en las condiciones alorreactivas, se usaron PBMC procedentes de donantes sanos HLA-A*02-negativos después de obtener su consentimiento informado. Se adquirieron monómeros HLA-A*02 de clase I biotinilados y recombinantes y tetrámeros A2 fluorescentes que contenían el COL6A3-002 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 HLA-A*02/COL6A3-002 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 avidéz, se incubaron unas 10^6 PBMC con el tetrámero HLA-A*A2/COL6A3-002 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. 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 (Dyna, Oslo, Noruega) e IL-2 (1000 U/ml). Los linfocitos T de gran avidéz 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.

Los tres TCR específicos de COL6A3-002 (R4P1D10, R4P3F9 y R4P3H3, véase la tabla 2), 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 procedentes de donantes sanos se estimularon *in vitro* mediante un método descrito en otro lugar (Walter et al., 2003 J Immunol., Nov 15;171(10):4974-8). La presentación del péptido COL6A3 se llevó a cabo del modo descrito en otro lugar (Hirano N. et al; Blood. 2006 Feb 15;107(4):1528-36). Las células específicas de la diana se seleccionaron una a una con multímeros HLA-A*02 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. Las regiones variables de las cadenas alfa y beta de los TCR R4P1D10, R4P3F9 y R4P3H3 se secuenciaron y se clonaron para proseguir con la caracterización funcional. R4P1D10 y R4P3H3 proceden de donantes positivos para HLA-A*02 y R4P3F9 procede de un donante negativo para HLA-A*02 (condiciones alorreactivas).

Tabla 3: Afinidad por SPR de los TCR de COL6A3-002 y de NYESO1-001

TCR	Constante de disociación en equilibrio (K_D) correspondiente al complejo HLA-A02/COL6A3-002, en μM	Constante de disociación en equilibrio (K_D) correspondiente al complejo HLA-A02/NYESO1-001, en μM
R4P1D10	16	No hay unión
R4P3F9	62	No hay unión
R4P3H3	102	No hay unión
1G4	No hay unión	7

Ejemplo 1: Receptor de linfocito T R4P1D10

Las cadenas alfa y beta del TCR R4P1D10 se clonaron del modo descrito en otro lugar, por ejemplo, tal y como se describe en la patente de EE.UU. 8.519.100, el contenido de la cual se incorpora aquí íntegramente como referencia sobre dichos métodos.

El TCR R4P1D10 está restringido al COL6A3-002 presentado por el HLA-A2 (véase la Tabla 3 precedente).

Tabla 4: Características de la cadena alfa de R4P1D10:

Inicio	Stop	Descripción	Secuencia
1	21	Segmento L (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (SEQ ID N.º 69)
1	113	Cadena V (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPL SVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSP ELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIR DSQPSDSATYLCASN
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	120	CDR3	CAVNFHDKIIF
116	130	Segmento J (TRAJ30)	DKIIFGKGTRLHILP
131	272	Región constante (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSVDYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLL MTLRLWSS

Tabla 5: Características de la cadena beta de R4P1D10:

Inicio	Stop	Descripción	Secuencia
1	19	Segmento L (TRBV9)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPV (SEQ ID N.º 70)
1	114	Cadena V (TRBV9)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLIT ATGQRVTLRCSRGDLSVYWYQQSLDQGLQ FLIHYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSEL NLSSLELGDSALYFCASSV
46	50	CDR1	SGDLS
68	73	CDR2	YYNGEE
110	122	CDR3	CASSVASAYGYTF

118	131	Cadena J (TRBJ1-2)	YGYTFGSGTRLTVV
132	308	Región constante (TRBC1)	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVKKRDF

R4P1D10 reconoce específicamente a COL6A3-002 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+ y fijan a ellos tetrameros HLA-A*02, respectivamente, cargados o con el péptido COL6A3-002 o con variantes de COL6A3-002 provistas de sustituciones de alanina y glicina (Figura 1) o diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de COL6A3-002 (Figura 2). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo.

La reexpresión de R4P1D10 conduce a la unión selectiva de los tetrameros HLA-A*02/COL6A3-002 pero no a la de los tetrameros HLA-A*02/NYESO1-001 en células de Jurkat J.RT3-T3.5 (Figura 3), células SUP-T1 (Figura 4) y linfocitos T CD8+ primarios humanos (Figura 5). Con cada tipo de célula se usó como control la reexpresión del TCR 1G4, que es específico de NYESO1-001, y la expresión ficticia.

El análisis de la unión por espectroscopía por SPR (resonancia de plasmones superficiales) correspondiente al R4P1D10, expresado como TCR soluble conforme a un método descrito (Willcox BE et al., 1999 Protein Sci., Nov;8(11):2418-23), y el complejo HLA-A*02/COL6A3-002 revela una afinidad de $K_D = 16 \mu M$ (Tabla 3). Como controles se usaron los datos de unión obtenidos por SPR correspondientes al TCR 1G4 con el HLA-A*02/NYESO1-001.

Ejemplo 2: Receptor de linfocito T R4P3F9

Las cadenas alfa y beta del TCR R4P3F9 se clonaron del modo descrito en otro lugar, por ejemplo, tal y como se describe en la patente de EE.UU. 8.519.100, el contenido de la cual se incorpora aquí íntegramente como referencia sobre dichos métodos.

El TCR R4P3F9 está restringido al COL6A3-002 presentado por el HLA-A2 (véase la Tabla 3 precedente).

Tabla 6:Características de la cadena alfa de R4P3F9

Inicio	Stop	Descripción	Secuencia
1	21	L segment (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (SEQ ID NO: 71)
1	111	V chain (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPL SVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSP ELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIR DSQPSDSATYLCA
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	123	CDR3	CAAYSGAGSYQLTF
113	133	J segment (TRAJ28)	YSGAGSYQLTFGKGTKLSVIP
134	274	Constant re- gion (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSVDYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLL MTLRLWSS

Tabla 7:Características de la cadena beta de R4P3F9

Inicio	Stop	Descripción	Secuencia
1	19	L segment (TRBV9)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPV (SEQ ID NO: 72)
1	114	V chain (TRBV9)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLIT ATGQRVTLRCSRGDLSVYWYQQSLDQGLQ FLIHYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSEL NLSSLELGDSALYFCASSV
46	50	CDR1	SGDLS
68	73	CDR2	YYNGEE
110	122	CDR3	CASSVESSYGYTF

118	131	J chain (TRBJ1-2)	YGYTFGSGTRLTVV
132	308	constant re- gion (TRBC1)	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVKRKDF

R4P3F9 reconoce específicamente a COL6A3-002 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+, respectivamente, cargadas con el péptido COL6A3-002 o con variantes de COL6A3-002 provistas de sustituciones de alanina y glicina (Figura 6) o diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la del COL6A3-002 (Figura 7). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo.

La reexpresión de R4P3F9 conduce a la unión selectiva de los tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002 pero no a la de los tetrámeros HLA-A*02/NYESO1-001 en células de Jurkat J.RT3-T3.5 (Figura 8) y células SUP-T1 (Figura 9). Con cada tipo de célula se usó como control la reexpresión del TCR 1G4, que es específico de NYESO1-001, y la expresión ficticia.

El análisis de la unión por espectroscopía por SPR correspondiente al R4P3F9 expresado como TCR soluble conforme a un método descrito (Willcox BE et al., 1999 Protein Sci., Nov;8(11):2418-23), y el complejo HLA-A*02/COL6A3-002 revela una afinidad de $K_D = 62 \mu M$ (Tabla 3). Como controles se usaron los datos de unión obtenidos por SPR correspondientes al TCR 1G4 con el HLA-A*02/NYESO1-001.

Ejemplo 3: Receptor de linfocito T R4P3H3

Las cadenas alfa y beta del TCR R4P3H3 se clonaron del modo descrito en otro lugar, por ejemplo, tal y como se describe en la patente de EE.UU. 8.519.100, el contenido de la cual se incorpora aquí íntegramente como referencia sobre dichos métodos.

El TCR R4P3H3 está restringido al COL6A3-002 presentado por el HLA-A2 (véase la Tabla 3 precedente).

Tabla 8:Características de la cadena alfa de R4P3H3

Inicio	Stop	Descripción	Secuencia
1	21	L segment (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (SEQ ID NO: 73)
1	112	V chain (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPL SVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSP ELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIR DSQPSDSATYLCAY
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	120	CDR3	CAVKAGNQFYF
115	130	J segment (TRAJ49)	GNQFYFGTGTSLTVIP
131	271	Constant re- gion (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSVDYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLL MTLRLWSS

Tabla 9:Características de la cadena beta de R4P3H3

Inicio	Stop	Descripción	Secuencia
1	19	L segment (TRBV7-8)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHT (SEQ ID NO: 74)
1	115	V chain (TRBV7-8)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRYK VAKRGQDVALRCDPISGHVSLFWYQQALGQ GPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFAERPEGS VSTLKIQRQTQQEDSAVYLCASSL
46	50	CDR1	SGHVS
68	73	CDR2	FQNEAQ
111	126	CDR3	CASSLLTSGGDNEQFF

122	135	J chain (TRBJ2-1)	NEQFFGPGTRLTVL
136	314	constant re- gion (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE AWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKA TLYAVLVSAVLMMAMVKKDSRG

R4P3H3 reconoce específicamente a COL6A3-002 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+, respectivamente, cargadas con el péptido COL6A3-002 o con variantes de COL6A3-002 provistas de sustituciones de alanina y glicina (Figura 10) o diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de COL6A3-002 (Figura 11). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo.

La reexpresión de R4P3H3 conduce a la unión selectiva de los tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002 pero no a la de los tetrámeros HLA-A*02/NYESO1-001 en células SUP-T1 (Figura 12). Como controles se usaron la reexpresión del TCR 1G4, que es específico de NYESO1-001, y la expresión ficticia.

El análisis de la unión por espectroscopía SPR correspondiente al R4P3H3 expresado como TCR soluble conforme a un método descrito (Willcox BE et al., 1999 Protein Sci., Nov;8(11):2418-23), y el complejo HLA-A*02/COL6A3-002 revela una afinidad de $K_D = 102 \mu M$ (Tabla 3). Como control se usaron los datos de unión obtenidos por SPR correspondientes al TCR 1G4 con el HLA-A*02/NYESO1-001.