

NUEVOS RECEPTORES DE CÉLULAS T MODIFICADOS GENÉTICAMENTE Y TERAPIAS INMUNOLÓGICAS QUE EMPLEAN LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con construcciones de reconocimiento de antígenos contra antígenos COL6A3. En particular, en la invención se proveen nuevas moléculas basadas en receptores de células T (TCR) modificados genéticamente que presentan selectividad y especificidad por tumores donde se expresan antígenos COL6A3. Los TCR de la invención, y los fragmentos de unión a antígeno COL6A3 derivados de ellos, son útiles en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de enfermedades cancerosas donde se expresa COL6A3. Además, se proveen ácidos nucleicos que codifican construcciones de reconocimiento de antígenos de la invención, vectores que comprenden estos ácidos nucleicos, células recombinantes donde se expresan estas construcciones de reconocimiento de antígenos y composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la invención.

DESCRIPCIÓN

Los colágenos son una superfamilia de proteínas que participan en el mantenimiento de la integridad de diversos tejidos. Los colágenos son proteínas de la matriz extracelular y comprenden un dominio de hélice triple como elemento estructural común. El colágeno VI es un componente estructural importante de las microfibrillas. La unidad estructural básica del colágeno VI es un heterotrímero de cadenas de colágeno alfa 1(VI), alfa 2(VI) y alfa 3(VI). Las cadenas alfa 1(VI) y alfa 2(VI) están codificadas por los genes COL6A1 y COL6A2, respectivamente. La proteína codificada por el gen COL6A3 es la subunidad alfa 3 del colágeno tipo VI (cadena de colágeno alfa 3(VI)) (Bertini et

al., 2002, Eur. J. Paediatr. Neurol, 6:193-8). Se comprobó que la expresión del gen de COL6A3 está asociada al progreso del cáncer de mama, se encuentra elevada en el cáncer de colon (Smith, M. J., 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 es útil como indicador del pronóstico del carcinoma colorrectal (Qiao, J., et al., Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics, Oncotarget, 6 de Octubre de 2015, 6(30):29929-29946). El gen COL6A3 localiza 2q37 en el genoma humano y contiene 44 exones. La proteína COL6A3 tiene 3177 aminoácidos y contiene 12 dominios del factor de Von Willebrand tipo A (vWA), un dominio de fibronectina tipo 3 y un dominio de inhibidores de proteasas de serina de la familia BPTI/Kunitz (KU).

Los blancos para la inmunoterapia basada en células T representan epítomos peptídicos derivados de proteínas asociadas a tumores o específicas de tumores, que son presentados por moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Estos antígenos asociados a tumores (TAA) pueden ser péptidos derivados de cualquier clase de proteínas, por ejemplo, enzimas, receptores, factores de transcripción, etcétera, que se expresan en las células tumorales correspondientes, y en comparación con las células inalteradas del mismo origen, generalmente están regulados positivamente.

Los elementos específicos de la respuesta inmune celular pueden reconocer y destruir selectivamente las células tumorales. A partir del aislamiento de células T con especificidad por antígenos tumorales en poblaciones de células infiltradas en tumores o de sangre periférica, puede inferirse que estas células tienen una participación importante en la defensa inmune natural contra el cáncer. En particular, las células T positivas para CD8, que reconocen péptidos que generalmente tienen entre 8 y 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o productos ribosómicos defectuosos (DRiP) que están localizados en el citosol y están asociados a moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) clase I, tienen una participación importante en esta respuesta. Las moléculas del MHC humano también se conocen como antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Un TCR es una proteína heterodimérica de la superficie celular que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y está asociada a proteínas invariables del complejo CD3, que median en la transducción de señales. Los TCR existen como heterodímeros $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que son estructuralmente similares pero tienen localizaciones anatómicas y probablemente funciones bastante diferentes. La porción extracelular de un $\alpha\beta$ TCR heterodimérico nativo consiste en dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende un dominio constante proximal a la membrana y un dominio variable distal. Cada uno de los dominios constante y variable comprende un enlace disulfuro entre sus cadenas. Los dominios variables contienen rizados altamente polimórficos análogos a las regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos. Mediante el uso de terapias génicas con TCR, pueden superarse diversos obstáculos actuales. Permiten conferirles las especificidades deseadas a las células T

propias de los pacientes y generar cantidades suficientes de células T en períodos de tiempo breves, con lo que se evita su agotamiento. Los TCR son transportados a las células T de memoria centrales o las células T con características de células madre, con lo cual puede garantizarse una persistencia y una función superiores después de la transferencia. Las células T con TCR modificados genéticamente se injertan en pacientes con cáncer que se han tornado linfopénicos debido a quimioterapia o irradiación, procedimientos que permiten un injerto eficiente pero inhiben la supresión inmune.

Si bien ha habido progreso en el desarrollo de fármacos de guía molecular para la terapia del cáncer, en la técnica subsiste la necesidad de nuevos agentes anticancerosos que se dirijan específicamente a moléculas altamente específicas de las células cancerosas. La presente invención aborda esa necesidad al proveer nuevos TCR dirigidos a COL6A3 diseñados por ingeniería genética, construcciones de TCR recombinantes, ácidos nucleicos, vectores y células huésped que se unen específicamente a uno o más de los epítomos de COL6A3 descritos y métodos para usar estas moléculas en el tratamiento del cáncer.

En un primer aspecto, el objeto de la invención se resuelve mediante una construcción de reconocimiento de antígeno que comprende un primer dominio que comprende tres regiones de determinación de la complementariedad (CDR) según SEQ ID N° 5 (CDRa1), 6 (CDRa2) y 7 (CDRa3) y un segundo dominio que comprende tres regiones de determinación de la complementariedad (CDR) según SEQ ID N° 13 (CDRb1), 14 (CDRb2) y 15 (CDRb3), donde al menos una de las regiones de determinación de la complementariedad es reemplazada por al menos una secuencia seleccionada del siguiente grupo: (a) SEQ ID N° 26

(CDRa1-mut1), y SEQ ID N° 37 a 49 (CDRb1-mut1 a CDRb1-mut13), preferiblemente SEQ ID N° 40, y (b) variantes mutadas de SEQ ID N° 26 y SEQ ID N° 37 a 49, preferiblemente SEQ ID N° 40, donde se han realizado intercambios de aminoácidos conservativos.

En otro aspecto, CDRa1 en una construcción de reconocimiento de antígeno puede tener una identidad de al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID N° 5.

En otro aspecto, CDRa2 en una construcción de reconocimiento de antígeno puede tener una identidad de al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos

aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID N° 6.

En otro aspecto, CDRa3 en una construcción de reconocimiento de antígeno puede tener una identidad de al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID N° 7.

En otro aspecto, CDRb1 en una construcción de reconocimiento de antígeno puede tener una identidad de al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos

aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID N° 13.

En otro aspecto, CDRb2 en una construcción de reconocimiento de antígeno puede tener una identidad de al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID N° 14.

En otro aspecto, CDRb3 en una construcción de reconocimiento de antígeno puede tener una identidad de al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos

aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% con la secuencia de aminoácidos según SEQ ID N° 15.

En el contexto de la presente invención, los inventores han identificado versiones mejoradas por ingeniería genética del TCR dirigido a COL6A3 R4P3F9 que comprenden secuencias de CDR1 mutadas en las cadena alfa y/o beta que dan como resultado mejoras en la estabilidad, el reconocimiento y la selectividad. Estas variantes de TCR maduras fueron seleccionadas en un método con dos pasos: uno para seleccionar la estabilidad y otro para seleccionar la afinidad de las variantes (véanse los ejemplos). Si bien los TCR de la invención comprenden regiones CDR1 mutadas, es probable que CDR2 y/o CDR3 también puedan mutarse para incrementar la afinidad/especificidad y/o la selectividad de unión, e idealmente estas CDR mutadas podrán incluirse en construcciones existentes.

Mediante la maduración por afinidad, se identificaron variantes con una actividad de unión al péptido HLA-A*02/COL6A3 considerablemente mayor y una especificidad conservada o mejorada. En comparación con el TCR C-1 original (TCR R4P3F9, que comprende una CDR salvaje, véase la tabla 5), todas las variantes de la invención mejoraron la liberación de IFN-gamma: permitieron alcanzar niveles más altos con menores concentraciones de carga de péptidos.

En el dominio variable, CDR1 y CDR2 se encuentran en la región variable (V) de una cadena polipeptídica, mientras que CDR3 abarca parte de la región V y todas las regiones de diversidad (D) y unión (J). Se asume que CDR3 es la CDR más variable y la responsable principal del reconocimiento específico y selectivo de un antígeno. Sorprendentemente, CDR1 también parece tomar contacto con los

péptidos en algunos TCR, por lo que también podría ser responsable del reconocimiento selectivo. En este caso, sin que se desee limitar la invención a una teoría específica, se cree que CDR1b mutada interactúa con la posición 8 del péptido COL6A3.

Los TCR heterodiméricos alfa-beta nativos comprenden una cadena alfa y una cadena beta. Cada cadena alfa comprende regiones variables, de unión y constantes, mientras que la cadena beta también suele contener una región de diversidad corta entre las regiones variable y de unión, aunque tiende a considerarse que esta región de diversidad forma parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones de determinación de complementariedad) integradas en una secuencia marco, una de las cuales es la región hipervariable denominada CDR3. Hay diversos tipos de regiones variables de la cadena alfa ($V\alpha$) y diversos tipos de regiones variables de la cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su estructura, las secuencias CDR1 y CDR2 y una secuencia de CDR3 parcialmente definida. En la nomenclatura IMGT, los tipos $V\alpha$ se designan con un número TRAV único, mientras que los tipos $V\beta$ se designan con un número TRBV único.

Preferiblemente, una construcción de reconocimiento de antígeno de la presente comprende las CDR1 a CDR3 respectivas de la región variable de un TCR modificado genéticamente según la invención. En la presente, se prefieren las construcciones de reconocimiento de antígenos (por ejemplo, TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) que comprenden al menos una secuencia CDR1 madurada, preferiblemente dos.

Las variantes de CDR de la presente, particularmente las variantes de CDR1, pueden modificarse sustituyendo uno o más residuos en diversos sitios en la

cadena peptídica, posiblemente de manera selectiva, de no indicarse lo contrario. Estas sustituciones son conservativas cuando se reemplaza un aminoácido por otro con una estructura y características similares, por ejemplo, cuando se reemplaza un aminoácido hidrófobo por otro. Aun más conservativo sería el reemplazo de aminoácidos con tamaños o naturalezas químicas idénticas o similares, por ejemplo, cuando se reemplaza leucina por isoleucina. En estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos son más frecuentemente toleradas que otras, lo cual suele estar correlacionado con similitudes en el tamaño, la carga, la polaridad y la hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo: esta es la base para definir las “sustituciones conservativas”. En la presente, las sustituciones conservativas preferidas se definen como intercambios en uno de los cinco grupos siguientes: grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg, Lys); grupo 4: residuos alifáticos no polares grandes (Met, Leu, Ile, Val, Cys); y grupo 5: residuos aromáticos grandes (Phe, Tyr, Trp).

Las sustituciones menos conservativas pueden abarcar el reemplazo de un aminoácido por otro con características similares que tiene un tamaño algo diferente, por ejemplo, el reemplazo de una alanina por un residuo de isoleucina.

Los términos “especificidad” y “especificidad por un antígeno”, según se los emplea en la presente con relación a antígenos determinados, denotan que la construcción de reconocimiento de antígeno puede unirse específicamente al

antígeno en cuestión, preferiblemente un antígeno COL6A3, más preferiblemente con una avidéz elevada, cuando el antígeno es presentado por HLA, preferiblemente HLA A2. Por ejemplo, puede considerarse que un TCR, como construcción de reconocimiento de antígeno, tiene “especificidad antigénica” por antígenos COL6A3 si las células T donde se expresan los TCR en respuesta a HLA que presentan COL6A3 secretan al menos aproximadamente 200 pg/ml o más (por ejemplo, 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) de interferón γ (IFN- γ) en un cultivo concurrente con células blanco HLA A2 tratadas con una concentración baja de un antígeno COL6A3, por ejemplo, los epítomos COL6A3 y los antígenos provistos más adelante (por ejemplo, aproximadamente 10^{-11} mol/l, 10^{-10} mol/l, 10^{-9} mol/l, 10^{-8} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l, 10^{-5} mol/l). Como alternativa o adicionalmente, puede considerarse que un TCR presenta “especificidad antigénica” por COL6A3 si las células T donde se expresa el TCR secretan al menos el doble de IFN- γ que el nivel de fondo no transducido de IFN- γ en un cultivo concurrente con células blanco tratadas con una concentración de antígenos COL6A3 baja. La “especificidad” descrita con anterioridad puede analizarse, por ejemplo, con un ELISA.

En una forma de realización alternativa o adicional de la invención, la construcción de reconocimiento de antígeno es estable y puede unirse específica y/o selectivamente a un antígeno COL6A3, donde el antígeno COL6A3 preferiblemente es una proteína o un péptido de un epítomo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 o una variante de ésta, donde la variante se obtiene mediante la eliminación, la adición, la inserción o la

sustitución de aminoácidos en no más de tres posiciones, preferiblemente dos y más preferiblemente no más de una.

Los términos “selectividad” y “reconocimiento/unión selectiva” hacen referencia a la propiedad de una construcción de reconocimiento de antígeno, tal como un TCR o un anticuerpo, de reconocer o unirse selectivamente a un único epítopo específico, donde preferiblemente hay una reactividad transversal escasa o sustancialmente nula con otros epítopos. Preferiblemente, “selectividad” y “reconocimiento/unión selectiva” implican que la construcción de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, un TCR) reconoce o se une selectivamente a un único epítopo específico, donde preferiblemente hay una reactividad transversal escasa o sustancialmente nula con otros epítopos y donde el epítopo es único para una proteína, de modo que la construcción de reconocimiento de antígeno presenta una reactividad transversal escasa o sustancialmente nula con otros epítopos o proteínas.

La construcción de reconocimiento de antígeno según la invención preferiblemente se selecciona entre un anticuerpo, o un derivado o un fragmento de éste, una molécula biespecífica o un receptor de células T (TCR), o un derivado o un fragmento de éste. Un derivado o un fragmento de un anticuerpo o un TCR de la invención preferiblemente conservan la capacidad de unión/reconocimiento del antígeno de la molécula original, particularmente su especificidad y/o su selectividad, según se explicó con anterioridad.

En una forma de realización de la invención, los TCR modificados genéticamente de la invención pueden reconocer antígenos COL6A3 de una manera dependiente del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) clase I. Una “manera dependiente del MHC clase I”, según se la emplea en la presente,

denota que el TCR provoca una respuesta inmune al unirse a antígenos peptídicos COL6A3 en el contexto de una molécula del MHC clase I. La molécula del MHC clase I puede ser cualquier molécula del MHC clase I conocida en la técnica, por ejemplo, moléculas HLA-A. En una forma de realización preferida de la invención, la molécula del MHC clase I es una molécula HLA-A2.

En la invención se proveen construcciones de reconocimiento de antígenos de cadena simple y construcciones de reconocimiento de cadena doble, así como otras variantes. En particular, en la invención se provee un TCR diseñado como una construcción de reconocimiento de antígeno, o un fragmento o un derivado de éste. Este TCR preferiblemente es de origen humano, es decir, ha sido generado a partir de un locus de TCR humano, por lo cual comprende secuencias de TCR humanos. Además, el TCR de la invención se caracteriza como un TCR madurado por afinidad, que puede reconocer específica y selectivamente el antígeno peptídico COL6A3.

Adicionalmente o como alternativa, en otra forma de realización de la invención se proveen construcciones de reconocimiento de antígenos como las descritas con anterioridad que inducen una respuesta inmune, donde la respuesta inmune preferiblemente se caracteriza por un incremento en el nivel del interferón (IFN) γ .

Los TCR de la invención pueden proveerse como moléculas α o β o γ y δ de cadena simple, o como alternativa, puede tratarse de construcciones de cadena doble compuestas por cadenas α y β o γ y δ .

Más preferiblemente, en algunas formas de realización adicionales, la invención está relacionada con construcciones de reconocimiento de antígenos que comprenden cualquiera, dos o todas las regiones CDR1 a CDR3 de las cadenas

de TCR modificados genéticamente de la invención (véase la tabla 1). Pueden preferirse construcciones de reconocimiento de antígenos que comprenden secuencias CDR naturales o modificadas genéticamente, que comprenden tres o dos residuos de aminoácidos modificados, preferiblemente uno solo. Una modificación en un residuo de aminoácido puede seleccionarse entre una inserción, una supresión o una sustitución. Más preferiblemente, los tres o dos residuos de aminoácidos modificados, preferiblemente el único residuo de aminoácido modificado, abarcan el primer o el último residuo de aminoácido de la secuencia CDR correspondiente. Si la modificación es una sustitución, en algunas formas de realización es preferible que se trate de una sustitución de aminoácido conservativa.

Los TCR de la invención también pueden comprender una región constante derivada de cualquier especie apropiada, tal como cualquier mamífero, por ejemplo, humano, rata, mono, conejo, burro o ratón. En una forma de realización de la invención, los TCR de la invención también comprenden una región constante humana. En algunas formas de realización preferidas, la región constante de un TCR de la invención puede estar ligeramente modificada, por ejemplo, mediante la introducción de secuencias heterólogas, preferiblemente secuencias de ratón, que pueden incrementar la expresión y la estabilidad. Además, pueden introducirse otras mutaciones de estabilización, según es conocido en la técnica (por ejemplo, DE 10 2016 123 893.7), por ejemplo, el reemplazo de aminoácidos desfavorables en las regiones V y/o la introducción de enlaces disulfuro entre los dominios C de los TCR y la eliminación de cisteínas desapareadas.

Según se los emplea en la presente, los términos “murina” o “humana”, aplicados a una construcción de reconocimiento de antígeno, un TCR o cualquier componente de un TCR descrito en la presente (por ejemplo, la región de determinación de la complementariedad (CDR), la región variable, la región constante, la cadena α o la cadena β), denotan que un TCR (o un componente de éste) proviene un locus de ratón o humano no reorganizado, respectivamente.

En una forma de realización de la invención, se proveen TCR quiméricos cuyas cadenas comprenden secuencias de múltiples especies. Preferiblemente, un TCR de la invención puede comprender una cadena α que comprende una región variable de una cadena α humana, y por ejemplo, una región constante de una cadena α de un TCR murino.

En una forma de realización, el TCR de la invención es un TCR humano que comprende regiones variables humanas según las formas de realización precedentes y regiones constantes humanas.

El TCR de la invención puede proveerse como un TCR de cadena simple (scTCR). Un scTCR puede comprender un polipéptido de una región variable de una primera cadena de TCR (por ejemplo, una cadena alfa) y un polipéptido de una segunda cadena de TCR completa (de longitud completa, por ejemplo, una cadena beta), o viceversa. Además, un scTCR puede comprender uno o más conectores entre dos o más polipéptidos. Un conector puede ser, por ejemplo, un péptido, que une dos cadenas simples, según se describe en la presente. En la invención también se provee un scTCR fusionado con una citoquina humana, tal como IL-2, IL-7 o IL-15.

Una construcción de reconocimiento de antígeno según la invención también puede proveerse en forma de un complejo multimérico que comprende al menos dos moléculas de scTCR, donde estas moléculas de scTCR están fusionadas con al menos una unidad de biotina y donde los scTCR están interconectados por una interacción biotina-estreptavidina para permitir la formación del complejo multimérico. La invención también abarca abordajes similares para la generación de TCR multiméricos. También se proveen complejos multiméricos de un orden superior, que comprenden más de dos scTCR de la invención.

Para los fines de la presente invención, un TCR es una unidad que comprende al menos un dominio variable TCR alfa o gamma y/o TCR beta o delta. En general, comprenden un dominio variable TCR alfa y un dominio variable TCR beta. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta$ o pueden adoptar un formato de cadena simple. Cuando se lo emplea en una terapia adoptiva, un TCR heterodimérico $\alpha\beta$, por ejemplo, puede transfectarse como cadenas completas que comprenden dominios citoplásmicos y transmembrana. Si se lo desea, puede haber un enlace disulfuro introducido entre los residuos de los dominios constantes correspondientes.

En una forma de realización preferida, la construcción de reconocimiento de antígeno es un TCR humano o un fragmento o un derivado de éste. Un TCR humano o un fragmento o un derivado de éste abarcan TCR que comprenden más de 50% de la secuencia del TCR humano correspondiente. Preferiblemente, solamente una pequeña parte de la secuencia del TCR es de origen artificial o deriva de otras especies. Sin embargo, se sabe que los TCR quiméricos, por ejemplo, los de origen humano que comprenden secuencias murinas en los dominios constantes, son ventajosos. Por consiguiente, se prefieren

particularmente los TCR según la presente invención que contienen secuencias murinas en la parte extracelular de sus dominios constantes.

Más aun, se prefiere que una construcción de reconocimiento de antígeno de la invención pueda reconocer su antígeno peptídico de una manera dependiente del antígeno leucocitario humano (HLA), preferiblemente de una manera dependiente de HLA-A02. El término “manera dependiente de HLA”, en el contexto de la presente invención, denota que la construcción de reconocimiento de antígeno solamente se une al antígeno cuando éste es presentado por HLA.

En una forma de realización, una construcción de reconocimiento de antígeno según la invención preferiblemente induce una respuesta inmune que preferiblemente se caracteriza por un incremento en el nivel del interferón (IFN) γ .

El término “polipéptido”, según se lo emplea en la presente, abarca los oligopéptidos y hace referencia a una cadena individual de aminoácidos conectados por uno o más enlaces peptídicos. Con relación a los polipéptidos de la invención, la porción funcional puede ser cualquier porción que comprende aminoácidos contiguos del TCR (o la variante funcional de TCR) del que forma parte, con la condición de que la porción funcional se una específicamente a un antígeno COL6A3, preferiblemente según se indica en la tabla 1. El término “porción funcional”, aplicado a un TCR (o una variante funcional de TCR) hace referencia a cualquier parte o fragmento de un TCR (o una variante funcional de TCR) de la invención que conserva la actividad biológica del TCR (o la variante funcional de TCR) del que forma parte (el TCR o la variante funcional de TCR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un

TCR (o una variante funcional de TCR) que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno COL6A3 (de una manera dependiente de HLA-A2) o detectar, tratar o prevenir el cáncer, en una medida similar, idéntica o superior al TCR (o la variante funcional de TCR) original.

Una porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en los extremos amino y/o carboxilo, que están ausentes en la secuencia de aminoácidos del TCR o la variante funcional original. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, la unión específica a antígenos COL6A3 y/o la capacidad de detectar, tratar o prevenir el cáncer, etcétera. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales incrementan la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR o la variante funcional original.

Según se ha mencionado, la funcionalidad de unión de un TCR de la invención puede proveerse en el marco de un anticuerpo. En la presente, el término “anticuerpo” hace referencia a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de éstas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno o un parátipo. Estas moléculas también se denominan “fragmentos de unión a antígenos” de moléculas de inmunoglobulinas. En la invención también se provee un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste que se unen específicamente a los antígenos descritos en la presente. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina conocida en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etcétera. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, por ejemplo, de ratón, conejo, cabra, caballo,

pollo, hámster, humano, etcétera. Como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado genéticamente, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o quimérico. El anticuerpo puede adoptar una forma monomérica o polimérica.

En la invención también se proveen porciones de unión a antígenos de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. Una porción de unión a antígeno puede ser cualquier porción que comprende al menos un sitio de unión a antígeno, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, dsFv, scFv, diacuerpos o triacuerpos. Puede generarse un fragmento de la región variable de un anticuerpo de cadena simple (scFv) que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada de un anticuerpo unido a un dominio V de una cadena liviana de un anticuerpo a través de un péptido sintético con abordajes de recombinación de ADN convencionales. Mediante abordajes de recombinación de ADN, también pueden prepararse fragmentos de regiones variables estabilizados con enlaces disulfuro (dsFv), aunque los fragmentos de anticuerpos de la invención no están limitados a estos ejemplos de fragmentos de anticuerpos. Además, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste pueden modificarse para incluir marcadores detectables, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) o partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

En la técnica se conocen métodos apropiados para producir anticuerpos. Por ejemplo, los métodos con hibridomas convencionales se describen, por ejemplo, en Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol, 5, 51:1-519 (1976); Harlow y Lane (editores), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); o C. A. Janeway

et al. (editores), Immunobiology, 8ª edición, Garland Publishing, Nueva York, NY (2011). Como alternativa, en la técnica se conocen otros métodos, tales como los métodos con hibridomas EBV (Haskard y Archer, J. Immunol. Methods, 74(2): 361-67 (1984); Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986)), o los sistemas de expresión con vectores de bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)). Además, se describen métodos para producir anticuerpos en animales no humanos, por ejemplo, en las Patentes de los EEUU 5545806, 5569825 y 5714352 y la Publicación de Solicitud de Patente de los EEUU N° 2002/0197266.

Algunas formas de realización de la invención también están relacionadas con TCR, o fragmentos o polipéptidos funcionales derivados de ellos, que son TCR solubles. Según se lo emplea en la presente, el término “receptor de células T soluble” hace referencia a variantes truncadas de cadena simple o heterodiméricas de TCR nativos, que comprenden al menos los dominios variables de la cadena α y la cadena β de un TCR unidos por un conector polipeptídico (SEQ ID N° 22, 24, 25 y 27). Las variantes solubles de TCR generalmente carecen de al menos los dominios transmembrana y citosólico de la proteína nativa, y en ocasiones, estas construcciones solubles preferiblemente no comprenden ninguna secuencia de dominio constante. En formas de realización preferidas, las construcciones de receptores de células T solubles de la invención comprenden construcciones que consisten en las secuencias de los dominios variables de las cadenas α y β que se proveen en la presente, conectadas por secuencias conectoras apropiadas. Las secuencias (de aminoácidos o nucleótidos) de los dominios variables de las cadenas α y β de un TCR pueden ser idénticas a las del TCR nativo correspondiente o pueden

comprender variantes de secuencias de dominios variables de cadenas α y β de TCR solubles, en comparación con las secuencias nativas correspondientes. El término “receptor de células T soluble”, según se lo emplea en la presente, también abarca TCR solubles con secuencias de dominios variables de las cadenas α y β de TCR solubles modificados o no modificados. Las modificaciones pueden estar en el marco y/o las regiones CDR de las secuencias de dominios variables de las cadenas α y β de los TCR solubles, y pueden abarcar, entre otras, mutaciones de eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos y cambios en las secuencias de ácidos nucleicos que no alteran la secuencia de aminoácidos. En cualquier caso, los TCR solubles de la invención presentan una funcionalidad de unión idéntica o preferiblemente superior a la de los TCR originales.

El problema precedente también se resuelve con un ácido nucleico que codifica una construcción de reconocimiento de antígeno de la invención o cualquiera de las construcciones de proteínas o polipéptidos mencionadas con anterioridad. El ácido nucleico preferiblemente comprende (a) una cadena que codifica una construcción de reconocimiento de antígeno según la invención, (b) una cadena complementaria de la cadena (a) o (c) una cadena que puede hibridar bajo condiciones estrictas con una molécula según (a) o (b). Aquellos versados en la técnica han de conocer las condiciones estrictas, específicamente a partir de Sambrook et al, “Molecular Cloning”. Adicionalmente, el ácido nucleico puede comprender otras secuencias necesarias para expresar la secuencia de ácido nucleico correspondiente y obtener una proteína, específicamente en una célula de mamífero/humana. El ácido nucleico usado puede estar contenido en un vector apropiado para permitir la expresión de la secuencia de ácido nucleico

correspondiente para obtener un polipéptido en una célula. Sin embargo, los ácidos nucleicos también pueden usarse para transformar células presentadoras de antígenos, sin restricciones a las células presentadoras de antígeno clásicas, tales como las células dendríticas, para que estas últimas produzcan las proteínas correspondientes en su superficie.

Un “ácido nucleico”, según se lo emplea en la presente, abarca un “polinucleótido”, un “oligonucleótido” y una “molécula de ácido nucleico”, y generalmente hace referencia a un polímero de ADN o ARN de cadena simple o doble, sintetizado u obtenido de fuentes naturales (por ejemplo, aislado y/o purificado), que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados y enlaces naturales, no naturales o alterados entre los nucleótidos, por ejemplo, enlaces de fosforamidato o fosforotioato en lugar de los enlaces de fosfodiéster que suele haber entre los nucleótidos de los oligonucleótidos no modificados.

Preferiblemente, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. Según se lo emplea en la presente, el término “recombinante” se aplica a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas cuando se unen segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos a moléculas de ácidos nucleicos que pueden replicarse en células vivas o (ii) moléculas que dan como resultado la replicación de las moléculas según (i). En la presente invención, la replicación puede darse in vitro o in vivo. Un ácido nucleico podrá comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los TCR, los polipéptidos o las proteínas descritas en la presente, así como cualquier porción o variante funcional de éstos.

Además, en la invención se provee un vector que comprende un ácido nucleico según la invención, tal como se describió con anterioridad. Deseablemente, el vector es un vector de expresión o un vector de expresión recombinante. En la presente, el término “vector de expresión recombinante” hace referencia a una construcción de ácido nucleico que permite la expresión de un ARNm, una proteína o un polipéptido en una célula huésped apropiada. Un vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante apropiado y puede emplearse para transformar o transfectar cualquier huésped apropiada. Los vectores apropiados abarcan aquellos diseñados para la propagación, la expansión y/o la expresión, por ejemplo, plásmidos o virus. Los ejemplos de vectores de expresión para animales abarcan pEUK-CI, pMAM y pMAMneo. Preferiblemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral. Un vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, por ejemplo, codones para el inicio y la terminación de la transcripción y la traducción, que son específicas para el tipo de célula huésped (por ejemplo, bacterias, hongos, plantas o animales) donde ha de introducirse el vector y ha de realizarse la expresión del ácido nucleico de la invención. Además, el vector de la invención puede comprender uno o más genes marcadores que permiten la selección de los huéspedes transformados o transfectados. Un vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica construcciones de la invención o a una secuencia de nucleótidos que es complementaria o híbrida con una secuencia de nucleótidos que codifica construcciones de la invención. Las selecciones de promotores abarcan, por ejemplo, promotores fuertes,

débiles, inducibles o con especificidad por tejidos o etapas del desarrollo determinadas. Un promotor puede ser un promotor no viral o viral. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para obtener una expresión transitoria y/o estable. Además, los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para obtener una expresión constitutiva o inducible.

La invención también está relacionada con una célula huésped que comprende una construcción de reconocimiento de antígeno según la invención. Específicamente, la célula huésped de la invención comprende un ácido nucleico o un vector según se describió con anterioridad. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, de una planta, un animal, un hongo o un alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, una bacteria o un protozoo. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, puede ser aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Para producir un TCR, un polipéptido o una proteína recombinante, la célula huésped preferiblemente es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO). Más preferiblemente, la célula huésped es una célula humana. Si bien la célula huésped puede ser de cualquier tipo, puede originarse a partir de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier etapa del desarrollo, preferiblemente es un leucocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Más preferiblemente, la célula huésped es una célula T. La célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, una célula T de una línea de células T cultivadas,

por ejemplo, Jurkat, SupT1, etcétera, o una célula T obtenida de un mamífero, preferiblemente una célula T o una célula T precursora de un paciente humano. Si se la obtiene de un mamífero, la célula T puede provenir de numerosas fuentes, por ejemplo, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. Preferiblemente, la célula T es una célula T humana. Más preferiblemente, la célula T es una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser de cualquier tipo y puede estar en cualquier etapa del desarrollo, lo que abarca, entre otras, células positivas para CD4 y/o positivas para CD8, células T auxiliares positivas para CD4, por ejemplo, células Th1 o Th2, células T positivas para CD8 (por ejemplo, células T citotóxicas), células que infiltran tumores (TIL), células T de memoria, células T vírgenes y similares. Preferiblemente, la célula T es una célula T positiva para CD8 o una célula T positiva para CD4.

Preferiblemente, la célula huésped de la invención es un linfocito, preferiblemente, un linfocito T, tal como un linfocito T positivo para CD4 o positivo para CD8. Además, la célula huésped preferiblemente es una célula T que reacciona específicamente con células tumorales donde se expresa COL6A3.

Un aspecto adicional de la presente invención está relacionado con construcciones de reconocimiento de antígenos, ácidos nucleicos, vectores, composiciones farmacéuticas y/o células huésped útiles en la medicina. En una forma de realización preferida, la utilidad en la medicina abarca el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades tumorales, por ejemplo, enfermedades tumorales malignas o benignas. Por ejemplo, una enfermedad

tumoral puede ser una enfermedad tumoral caracterizada por la presencia de células cancerosas o tumorales donde se expresa COL6A3.

Con relación a las aplicaciones médicas mencionadas con anterioridad para las construcciones de reconocimiento de antígenos u otros materiales derivados de ellas, el cáncer que se desea tratar y/o diagnosticar puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer anal, de canal anal o anorrectal, cáncer de ojo, cáncer de conducto biliar intrahepático, cáncer articular, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de cavidad oral, cáncer de vagina, cáncer de 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 nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, omento o mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de uréter o cáncer de vejiga urinaria. Un cáncer preferido es el cáncer de cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, porción anorrectal, vagina, vulva o pene. Un cáncer particularmente preferido es un cáncer positivo para COL6A3, por ejemplo, cáncer gastrointestinal o cáncer gástrico.

Las construcciones, las proteínas, los TCR, los anticuerpos, los polipéptidos y los ácidos nucleicos de la invención son particularmente útiles en la terapia inmune, preferiblemente, en la terapia con células T adoptivas. La administración de los compuestos de la invención puede abarcar, por ejemplo, la infusión de células T de la invención en el paciente. Preferiblemente, las células T son células T autólogas del paciente y son introducidas in vitro mediante un ácido nucleico o una construcción de reconocimiento de antígeno de la presente invención.

En WO 2016/011210 se describen células diseñadas para la terapia adoptiva, incluyendo células NK y células T, composiciones que las contienen y métodos para administrarlas en sujetos. Las células pueden contener receptores de antígenos modificados genéticamente que se unen específicamente a antígenos, por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos (CAR) o receptores coestimuladores.

El objetivo de la invención también se cumple con un método para manufacturar una línea celular donde se expresa una construcción de reconocimiento de antígeno con especificidad por COL6A3, que comprende

- a. proveer una célula huésped apropiada,
- b. proveer una construcción genética que comprende una secuencia que codifica una construcción de reconocimiento de antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- c. introducir la construcción genética en la célula huésped apropiada y
- d. expresar la construcción genética en la célula huésped apropiada.

El método también puede comprender presentar la construcción de reconocimiento de antígeno en la superficie de la célula huésped apropiada.

En otras formas de realización preferidas, la construcción genética es una construcción de expresión que comprende una secuencia promotora unida operativamente a una secuencia codificante.

Preferiblemente, la construcción de reconocimiento de antígeno proviene de un mamífero, preferiblemente un ser humano. La célula huésped apropiada preferida para usar en el método de la invención es una célula de mamífero, tal como una célula humana, particularmente un linfocito T humano. Las células T útiles en la invención abarcan las que se describieron con anterioridad.

La invención también abarca formas de realización donde la construcción de reconocimiento de antígeno es un TCR modificado, donde la modificación abarca la adición de dominios funcionales, por ejemplo, una marca o una sustancia terapéuticamente activa. También abarca los TCR con dominios alternativos, por ejemplo, un dominio de anclaje a la membrana alternativo en lugar de la región transmembrana endógena.

Deseablemente, el sistema de transfección para introducir la construcción genética en la célula huésped apropiada es un sistema basado en un vector retroviral. Estos sistemas son bien conocidos por aquellos versados en la técnica.

El método de la invención también puede comprender aislar y purificar la construcción de reconocimiento de antígeno a partir de la célula y opcionalmente reconstituir los fragmentos de la construcción de reconocimiento de antígeno traducidos en una célula T.

En un aspecto alternativo de la invención, se provee una célula T que se obtiene o puede obtenerse con un método para producir receptores de células T (TCR) que presentan especificidad por células tumorales y tienen una avidéz elevada, según se describió con anterioridad. La célula T depende de la célula huésped empleada en el método de la invención, por ejemplo, una célula T humana o no humana, preferiblemente una célula T humana.

Los TCR, los polipéptidos, las proteínas (incluyendo sus variantes funcionales), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células huésped (incluyendo sus poblaciones) y los anticuerpos (incluyendo sus porciones de unión a antígeno) de la invención pueden aislarse y/o purificarse. El término “aislado”, según se lo emplea en la presente, denota removido de su ambiente natural. El término “purificado”, según se lo emplea en la presente, implica la presencia de una mayor pureza, donde la “pureza” es un término relativo y no ha de ser interpretado de manera absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente 50%, superior a 60%, 70%, 80%, 90% o 95% o 100%.

Las construcciones de reconocimiento de antígenos de la invención, los TCR, los polipéptidos, las proteínas (incluyendo sus variantes funcionales), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células huésped (incluyendo sus poblaciones) y los anticuerpos (incluyendo sus porciones de unión a antígeno) de la invención, que en conjunto pueden denominarse “materiales de TCR de la invención”, pueden formularse en composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas. En este contexto, en la invención se provee una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las construcciones de reconocimiento de antígenos, los TCR, los polipéptidos, las

proteínas, las porciones funcionales, las variantes funcionales, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión, las células huésped (incluyendo sus poblaciones) o los anticuerpos (incluyendo sus porciones de unión a antígeno) descritos en la presente y un vehículo, un excipiente y/o un estabilizador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen cualquiera de los materiales de TCR de la invención pueden comprender más de un material de TCR de la invención, por ejemplo, un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más TCR diferentes (incluyendo porciones o variantes funcionales de éstos). Como alternativa, una composición farmacéutica puede comprender un material de TCR de la invención en combinación con uno o más agentes o fármacos activos adicionales, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etcétera. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. En las composiciones farmacéuticas, el vehículo puede ser cualquiera de los que suelen usarse para los materiales de TCR de la invención en cuestión. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por aquellos versados en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que no produzca efectos secundarios perjudiciales ni toxicidad bajo las condiciones de uso.

Por ende, también se provee una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los productos descritos en la presente y materiales de TCR de la invención, específicamente cualquier proteína, ácido nucleico o célula huésped.

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica es útil para una inmunoterapia, preferiblemente una terapia con células adoptivas.

Preferiblemente, el material de TCR de la invención se administra por inyección, por ejemplo, por vía intravenosa. Cuando el material de TCR de la invención es una célula huésped donde se expresa un TCR de la invención (o una variante funcional de éste), el vehículo farmacéuticamente aceptable puede abarcar cualquier vehículo isotónico, por ejemplo, solución salina normal (aproximadamente 0,90% p/v de NaCl en agua, aproximadamente 300 mOsm/l de NaCl en agua o aproximadamente 9,0 g de NaCl por litro de agua), la solución de electrolitos NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), aproximadamente 5% de dextrosa en agua o lactato de Ringer. En una forma de realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable se complementa con albúmina de suero humano.

En la invención, la cantidad o la dosis administrada del material de TCR de la invención (por ejemplo, la cantidad de células cuando el material de TCR de la invención abarca una o más células) pueden ser suficientes para ejercer, por ejemplo, un efecto terapéutico o profiláctico en un sujeto o un animal durante un período de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de TCR de la invención debe ser suficiente para obtener la unión a un antígeno de un cáncer o detectar, tratar o prevenir un cáncer en un período de aproximadamente 2 horas o más, por ejemplo, entre 12 y 24 horas o más desde el momento de la administración. En determinadas formas de realización, el período de tiempo podría ser incluso más prolongado. La dosis es determinada en función de la eficacia del material de TCR de la invención empleado y la condición del animal

(por ejemplo, el ser humano) que se desea tratar, así como su peso corporal.

Las composiciones farmacéuticas, los TCR (incluyendo sus variantes funcionales), los polipéptidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes o las células o las poblaciones de células huésped de la invención pueden usarse en métodos para tratar o prevenir cánceres o tumores premalignos positivos para COL6A3. Se cree que los TCR de la invención (y sus variantes funcionales) se unen específicamente al antígeno COL6A3, de modo tal que al expresarse estos TCR (o proteínas, polipéptidos o variantes funcionales de la invención relacionadas con ellos) en una célula, pueden mediar una respuesta inmune contra células blanco donde se expresan antígenos COL6A3. En este contexto, en la invención se provee un método para tratar o prevenir una afección, particularmente un cáncer, en un mamífero, que comprende administrarle al mamífero cualquier composición farmacéutica o construcción de reconocimiento de antígeno descrita en la presente, particularmente TCR (o variantes funcionales de éstos), polipéptidos o proteínas, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier TCR (o variante funcional de éste), polipéptido o proteína descrita en la presente o cualquier célula o población de células huésped que comprenden vectores recombinantes que codifican cualquier construcción (o variante funcional de ésta), polipéptido o proteína de la invención, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la afección en el mamífero, donde la afección es un cáncer, preferiblemente un cáncer positivo para COL6A3.

Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención abarcan estabilizadores, por ejemplo, SPGA, hidratos de carbono (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas, por ejemplo, albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas, por ejemplo, suero bovino o leche descremada, y amortiguadores (por ejemplo, amortiguadores de fosfato).

Según se los emplea en la presente, los términos “tratar” y “prevenir” y sus derivados no implican necesariamente un tratamiento ni una prevención 100% completos. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención asociados a beneficios o efectos terapéuticos potenciales, lo cual ha de resultar conocido para aquellos versados en la técnica. En este contexto, los métodos de la invención pueden proveer cualquier medida de tratamiento o prevención de una afección en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención provistos por un método de la invención pueden abarcar el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas, por ejemplo, un cáncer. Por ejemplo, el tratamiento o la prevención pueden abarcar promover la regresión de un tumor. En la presente, la “prevención” también puede abarcar la demora del inicio de una afección o un síntoma.

La presente invención también está relacionada con un método para tratar un cáncer, que comprende administrar un TCR, un ácido nucleico o una célula huésped de la presente invención en combinación con al menos un agente quimioterapéutico y/o radioterapia.

También se provee un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende

(a) aislar una célula del sujeto,

(b) transformar la célula con al menos un vector que codifica una construcción de reconocimiento de antígeno de la presente invención para producir una célula transformada,

(c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas y

(d) administrar la pluralidad de células transformadas en el sujeto.

También se provee un método para tratar un cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende

(a) aislar una célula de un donante saludable,

(b) transformar la célula con un vector que codifica una construcción de reconocimiento de antígeno de la presente invención para producir una célula transformada,

(c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas y

(d) administrar la pluralidad de células transformadas en el sujeto.

También se provee un método para detectar un cáncer en una muestra biológica, que comprende

(a) poner en contacto la muestra biológica con una construcción de reconocimiento de antígeno de la presente invención y

(b) detectar la unión de la construcción de reconocimiento de antígeno a la muestra biológica.

En algunas formas de realización, el método para detectar un cáncer se pone en práctica in vitro, in vivo o in situ.

También se provee un método para detectar la presencia de una afección en un mamífero. El método comprende (i) poner en contacto una muestra que

comprende una o más células del mamífero con cualquier TCR (o variante funcional de éste), polipéptido, proteína, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula o población de células huésped, anticuerpo, porción de unión a antígeno de anticuerpo o composición farmacéutica de la invención para formar un complejo y (ii) detectar el complejo, donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de la afección en el mamífero, donde la afección es un cáncer, tal como un tumor maligno positivo para COL6A3.

En método de la invención para detectar una afección en un mamífero, la muestra de células puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de células o fracciones de lisados de células completas, por ejemplo, fracciones nucleares o citoplasmáticas, fracciones de proteínas completas o fracciones de ácidos nucleicos.

En el método de detección de la invención, el contacto con el mamífero puede ocurrir in vitro o in vivo. Preferiblemente, el contacto ocurre in vitro.

Además, la detección del complejo puede realizarse de diversas maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, las construcciones de reconocimiento de antígenos (o sus variantes funcionales), los polipéptidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células o las poblaciones de células huésped, los anticuerpos o los TCR de la invención, o las porciones de unión a antígeno de éstos, pueden marcarse con elementos detectables, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) o partículas elementales (por ejemplo, partículas de oro).

En los métodos de la invención donde se administran células o poblaciones de células huésped, las células pueden ser alogénicas o autólogas con relación al mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas con relación al mamífero.

En las aplicaciones médicas mencionadas con anterioridad para el material de TCR de la invención, el cáncer que se trata y/o se diagnostica puede ser cualquier cáncer, por ejemplo, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer anal, de canal anal o anorrectal, cáncer de ojo, cáncer de conducto biliar intrahepático, cáncer articular, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de cavidad oral, cáncer de vagina, cáncer de 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 nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, omento o mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de uréter o cáncer de vejiga urinaria. Un cáncer preferido es el cáncer de cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, porción anorrectal, vagina, vulva o pene. Un cáncer particularmente preferido es un cáncer positivo para COL6A3, por ejemplo, cáncer gastrointestinal o cáncer gástrico.

En general, en la invención se provee un método para tratar un sujeto que padece un tumor o una enfermedad tumoral, que comprende administrar construcciones de reconocimiento de antígenos, ácidos nucleicos, vectores, composiciones farmacéuticas y/o células huésped de la invención. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto que necesita el tratamiento. En formas de realización preferidas, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un paciente humano, que padece un tumor o una enfermedad tumoral positiva para COL6A3.

Más adelante, la presente invención se describirá con mayor detalle pero de manera no limitativa a través de ejemplos, figuras y secuencias. Para los fines de la invención, todas las referencias citadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad. A continuación se provee una descripción de las figuras y las secuencias.

En la figura 1 se representa la conversión de un TCR en un TCR de cadena simple (scTv) $V\alpha/V\beta$ estabilizado presentado en la superficie de levaduras. Las moléculas de scTv en la superficie de *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 transformadas se colorearon con un anticuerpo anti-Vbeta1 marcado con FITC y el tetrámero HLA-A*02/COL6A3-002 marcado con PE. Se comparó un scTv R4P3F9 no modificado (panel izquierdo, SEQ ID N° 22) con un clon de scTv que tenía mutaciones puntuales para estabilizar su andamiaje, que se obtuvo mediante una selección de bibliotecas de scTv con mutaciones aleatorias.

En la figura 2 se representa la maduración por afinidad de scTv presentados en la superficie de levaduras. Las moléculas de scTv estabilizadas, con CDR1 beta madurada por afinidad o no, se colorearon con tetrámeros HLA-A*02 que

contenían COL6A3-002 (SEQ ID N° 1) y se sometieron a un contraste con una mezcla de tetrámeros HLA-A*02 que contenían 9 péptidos (SEQ ID N° 28 a 36) con secuencias altamente similares a la de COL6A3-002. El scTv estabilizado (SEQ ID N° 27) con la secuencia CDR1 de la cadena beta no madurada RSGDLS (SEQ ID N° 13) se comparó con clones de scTv con las secuencias CDR1 de la cadena beta maduras por afinidad AMDHPY (SEQ ID N° 40) y ARWHRN (SEQ ID N° 39).

En la figura 3 se representan perfiles de elución por cromatografía de exclusión por tamaño de las variantes de fusión del Fab-scTv anti-CD3 R4P3F9S 75-1 a 75-25.

En la figura 4 se representa la cinética de la unión a HLA-A*02/COL6A3-002 de las variantes de fusión del Fab-scTv anti-CD3 R4P3F9S 75-1 a 75-25, determinada mediante una interferometría en biocapas. Se indican las concentraciones analizadas de HLA-A*02/COL6A3-002.

En la figura 5 se representa el análisis de la unión de las variantes de fusión del Fab-scTv anti-CD3 R4P3F9S 75-1 a 75-25 en la interferometría en biocapas (BLI). Se analizó HLA-A*02 1 μ M en complejos con los péptidos similares indicados.

En la figura 6 se representa una comparación de la cinética de unión a HLA-A*02/COL6A3-002 y HLA-A*02/COL6A1-001 (SEQ ID N° 30) de diversas variantes de fusión del Fab-scTv anti-CD3 R4P3F9S. Se indican las concentraciones analizadas de las moléculas Fab-scTv.

En la figura 7 se representa la coloración de células T CD8⁺ humanas donde se expresaba una variante del TCR R4P3F9 madurada con tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002 marcados con PE. Como control, no se expresó ningún TCR

(simulación) o se expresó un TCR 1G4 con especificidad por NYESO1-001 y se usó una coloración con tetrámeros HLA-A*02/NYESO1-001 marcados con PE.

En la figura 8 se representa la liberación de IFN-gamma desde células T CD8⁺ humanas donde se expresaba una variante del TCR R4P3F9 madurada en respuesta a COL6A3-002. Como control, no se expresó ningún TCR (simulación) o se expresó un TCR 1G4 con especificidad por NYESO1-001. La liberación de IFN-gamma se determinó mediante un ELISA después del cultivo concurrente de células T CD8⁺ electroporadas con células T2 cargadas con una serie de diluciones de COL6A3-002.

En la figura 9 se representa la liberación de IFN-gamma desde células T CD8⁺ humanas donde se expresaba una variante del TCR R4P3F9 madurada en respuesta a COL6A3-002 y diversos péptidos similares. Como control, no se expresó ningún TCR (simulación) o se expresó un TCR 1G4 con especificidad por NYESO1-001. La liberación de IFN-gamma se determinó mediante un ELISA después del cultivo concurrente de células T CD8⁺ electroporadas con células T2 cargadas con una serie de diluciones de COL6A3-002 o péptidos similares.

En la figura 10 se representa la coloración de células T CD8⁺ humanas donde se expresaba una variante del TCR R4P3F9 madurada con tetrámeros péptido-HLA-A*02 marcados con PE. Como control, no se expresó ningún TCR (simulación) o se expresó un TCR 1G4 con especificidad por NYESO1-001 y se usó una coloración con tetrámeros HLA-A*02/NYESO1-001 marcados con PE.

En la figura 11 se representa la liberación de IFN-gamma desde células T CD8⁺ humanas donde se expresaba una variante del TCR R4P3F9 madurada en respuesta a COL6A3-002 o COL6A1-001. Como control, no se expresó ningún TCR (simulación) o se expresó un TCR 1G4 con especificidad por NYESO1-001. La liberación de IFN-gamma se determinó mediante un ELISA después del cultivo concurrente de células T CD8⁺ electroporadas con células T2 cargadas con una serie de diluciones de COL6A3-002 o COL6A1-001.

En la figura 12 se representa la liberación de IFN-gamma desde células T CD8⁺ humanas donde se expresaba una variante del TCR R4P3F9 madurada en un cultivo concurrente con diversas líneas de células tumorales. En las células SF539, SW982 y Hs840.T, el péptido blanco se observó en niveles diferentes. El péptido blanco no se detectó en las células MCF-7. Como control, se analizaron células efectoras sin TCR exógenos junto con las células con el TCR de interés. La liberación de IFN-gamma se determinó mediante un ELISA. *representa un punto de datos fuera de la escala.

Tabla 1. Secuencias de péptidos de la invención (las posiciones son según la numeración IMGT)

(François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; presentación de proteínas: TRAV humanos (*Homo sapiens*); repertorio IMGT: IMGT®, The International ImMunoGenetics Information System®, <http://www.imgt.org>; creado el 16/03/2011, versión 03/06/2016; François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux; presentación de proteínas: TRBV humanos (*Homo sapiens*); repertorio IMGT: IMGT®, The International ImMunoGenetics Information System®, <http://www.imgt.org>; creado el 16/03/2011, versión 03/06/2016)

SE Q ID Nº	Nombre	Descripción	Secuencia
1	COL6A3-002		FLLDGSANV
2	R4P3F9 alfa	TCR R4P3F9, cadena alfa completa	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNS GPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFFWYR QYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNK ASQYVSLIRDSQPSDSATYLC AAYSGAGS YQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFE TDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTL RLWSS
3	R4P3F9 alfa, guía	TCR R4P3F9, péptido guía de la cadena alfa	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ
4	R4P3F9 alfa, variable	TCR R4P3F9, dominio variable de	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLC AAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIP

		la cadena alfa	
5	R4P3F9 CDRa1	TCR R4P3F9, CDR1 de la cadena alfa	DRGSQS
6	R4P3F9 CDRa2	TCR R4P3F9, CDR2 de la cadena alfa	IYSNGD
7	R4P3F9 CDRa3	TCR R4P3F9, CDR3 de la cadena alfa	CAAYSGAGSYQLT
8	R4P3F9 alfa constante	TCR R4P3F9, dominio constante de la cadena alfa	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKS NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFP SPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
9	R4P3F9 alfa constante, inicio	TCR R4P3F9, inicio del dominio constante	NIQN

		de la cadena alfa	
10	R4P3F9 beta	TCR R4P3F9, cadena beta completa	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQTPKH LITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLD QGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFP DLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYG YTFGSGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWWVN GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLS SRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTS VSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALV LMAMVKRKDF
11	R4P3F9 beta, guía	TCR R4P3F9, péptido guía de la cadena beta	MGFRLLCCVAFCLLGAGPV
12	R4P3F9 beta variable	TCR R4P3F9, dominio variable de la cadena beta	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDL SVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGN ILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYF CASSVESSYGYTFGSGTRLTVV

13	R4P3F9 CDRb1	TCR R4P3F9, CDR1 de la cadena beta	RSGDLS
14	R4P3F9 CDRb2	TCR R4P3F9, CDR2 de la cadena beta	YYNGEE
15	R4P3F9 CDRb3	TCR R4P3F9, CDR3 de la cadena beta	CASSVESSYGYT
16	R4P3F9 beta constante	TCR R4P3F9, dominio constante de la cadena beta	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN PRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDF
17	R4P3F9 beta	TCR R4P3F9, , inicio 1 del	EDLNK

	constante, inicio 1	dominio constante de la cadena beta	
18	R4P3F9 beta constante, inicio 2	TCR R4P3F9, , inicio 2 del dominio constante de la cadena beta	EDLKN
19	Aga2p R4P3F9	Proteína de fusión Aga2p con un scTv R4P3F9 y marcas	MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSP LESTPYSLSTTTILANGKAMQGVFEYYKSVT FVSNCGSHPSTTSKGSPINTQYVFGGGGS DYKDDDDKGGGASQKEVEQNSGPLSVPE GAIASLNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSP ELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSL LIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGK GTKLSVIPNIQNGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRS GDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERA KGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSLELGDS

			ALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLTVVEDLN KAAAGGSGGEQKLISEEDL
20	Aga2p	Secuencia de guía y Aga2p	MQLLRCSIFSVIASVLAQELTTICEQIPSPT LESTPYSLSTTTILANGKAMQGVFEYYKSVT FVSNCGSHPSTTSKGSPINTQYVF
21	Marca FLAG	Marca FLAG más conectores	GGGGSDYKDDDDKGGGAS
22	scTv R4P3F9	Dominios variables de cadena simple de R4P3F9 con un conector; aF55S en el dominio variable alfa	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS QSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSSATYLC AAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKHLIT ATGQRVTLRCSPRSGDLVYWYQQSLDQ GLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGY TFGSGTRLTVVEDLNK
23	Marca Myc	Conector y marca Myc	AAAGGSGGEQKLISEEDL
24	scTv R4P3F9, bQ43K	scTv R4P3F9 con la mutación de	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS QSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSSATYLC AAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKHLIT

		estabilizaci ón bQ43K en el dominio variable beta	ATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWKQSLDQG LQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDL HSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGYT FGSGTRLTVVEDLNK
25	scTv R4P3F9, bL72S	scTv R4P3F9 con la mutación de estabilizaci ón bL72S en el dominio variable beta	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGS QSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSSATYLC AAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKHLIT ATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQ GLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGY TFGSGTRLTVVEDLNK
26	CDRa1, mutante 1	Mutación aG29R	DRRSQS
27	scTv R4P3F9S	Versión estabilizada del scTv R4P3F9	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRRS QSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSSATYLC AAYSGAGSYQLTFGKGTKLSVIPGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKH LITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWKQSLD

			QGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFP DLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYG YTFGSGTRLTVV
28	AGRN- 001	Péptidos similares	ALLDGRVQL
29	CLASP1- 001	Péptidos similares	RLLDGAFKL
30	COL6A1- 001	Péptidos similares	ILLDGSASV
31	COL6A2- 001	Péptidos similares	FLLDGSERL
32	COL6A3- 006	Péptidos similares	FLFDGSANLV
33	COL6A3- 008	Péptidos similares	FLFDGSANL
34	COL6A3- 014	Péptidos similares	FLLDGSEGV
35	VWA2- 001	Péptidos similares	FLLDGSNSV
36	VWF-001	Péptidos similares	FLLDGSSRL
37	CDRb1, mutante 1	Cadena beta, variante de CDR1 1	ARWHNN

38	CDRb1, mutante 2	Cadena beta, variante de CDR1 2	AKDHLN
39	CDRb1, mutante 3	Cadena beta, variante de CDR1 3	ARWHRN
40	CDRb1, mutante 4	Cadena beta, variante de CDR1 4	AMDHPY
41	CDRb1, mutante 5	Cadena beta, variante de CDR1 5	ATDHYN
42	CDRb1, mutante 6	Cadena beta, variante de CDR1 6	ARYHTN
43	CDRb1, mutante 7	Cadena beta, variante de CDR1 7	APYHLN

44	CDRb1, mutante 8	Cadena beta, variante de CDR1 8	AKDHTN
45	CDRb1, mutante 9	Cadena beta, variante de CDR1 9	ARYHRN
46	CDRb1, mutante 10	Cadena beta, variante de CDR1 10	ARWHSN
47	CDRb1, mutante 11	Cadena beta, variante de CDR1 11	ATDHYN
48	CDRb1, mutante 12	Cadena beta, variante de CDR1 12	RWGDLN
49	CDRb1, mutante 13	Cadena beta, variante de CDR1 13	ARDHLN

50	75-1	Cadena pesada Fab con un scTv R4P3F9S estabilizado	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQA PGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGDS DWYFDVWGQGT LVT VSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGQKEVE QNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DRGSQSFF WYRQYSGKSPELIMSIY SNGDKEDGRFTA QLNKASQYV SLLIRDSQP SDSATYLCAAYS GAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKH LITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWKQSLD QGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQFP DLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYG YTFGSGTRLTVVEDLKN
51	75-cadena pesada Fab	Cadena pesada Fab	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQA PGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGDS DWYFDVWGQGT LVT VSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

			SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTSPPSPAPPVAG
52	75- cadena liviana Fab	Cadena liviana Fab	MKWVTFISLLFLFSSAYSIDIQMTQSPSSLSA SVGDRVITITCRASQDIRNYLNWYQQKPGK APKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
53	1G4 alfa	TCR 1G4, cadena alfa completa	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQTQIPAALS VPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSG RSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIP TFGRGTS LIVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSD FACANAF NNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLNFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLW SS
54	1G4 alfa, guía	TCR 1G4, péptido guía de la cadena alfa	METLLGLLILWLQLQWVSSK

55	1G4 alfa variable	TCR 1G4, dominio variable de la cadena alfa	QEVTPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRL NASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCV RPTSGGSYIPTFGRGTSLIVHP
56	1G4 alfa constante	TCR 1G4, dominio constante de la cadena alfa	YIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKS NSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFP SPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
57	1G4 beta	TCR 1G4, cadena beta completa	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQ VLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDP GMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGN TGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFE PSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWGRADC GFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKRKDSRG
58	1G4 beta, guía	TCR 1G4, péptido guía de la	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNA

		cadena beta	
59	1G4 beta variable	TCR 1G4, dominio variable de la cadena beta	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEY MSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEV PNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYF CASSYVGNTGELFFGEGSRLTVL
60	1G4 beta constante	Dominio constante de la cadena beta	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN PRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSR G
61	NYESO1- 001	Péptido control	SLLMWITQV
62	C-14 beta; C-5 beta	C-14; cadena beta completa del TCR C- 5 con la mutante 4 de CDRb1	MGFRLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQTPKH LITATGQRVTLRCSPAMDHPYVYWYQQSL DQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQF PDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSY GYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEP EAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWW NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFT

			SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAL VLMAMVKRKDF
63	C-14 alfa	Cadena alfa completa del TCR C-14 con la mutante 1 de CDRa1	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNS GPLSVPEGAIASLNCTYSDRRSQSFFWYR QYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNK ASQYVSLIRDSQPSSATYLCAAYSGAGS YQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFE TDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTL RLWSS
64	75-5	Cadena pesada Fab con un scTv R4P3F9S estabilizado y la mutante 4 de CDRb1	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQA PGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFDRFTI SVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGDSDWYFDVWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGQKEVE QNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFF WYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLIRDSQPSSATYLCAAYS GAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSG

			GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKH LITATGQRVTLRCSPAMDHPYVYWKQSL DQGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQF PDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSY GYTFGSGTRLTVVEDLKN
65	75-14	Cadena pesada Fab con un scTv R4P3F9S estabilizado , la mutante 1 de CDRa1 y la mutante 4 de CDRb1	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQA PGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGDSDWYFDVWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGQKEVE QNSGPLSVPEGAIASLNCTYSRRRSQSFF WYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYS GAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVTQTPKH LITATGQRVTLRCSPAMDHPYVYWKQSL DQGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQQF PDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSY GYTFGSGTRLTVVEDLKN
66	75-25	Cadena pesada Fab	MKWVTFISLLFLFSSAYSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQA

		con un scTv R4P3F9S estabilizado en la orientación beta/alfa y la mutante 1 de CDRa1	PGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGDSDWYFDVWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTSPSPAPPVAGGVGTQT PKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWKQ SLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNISERFSAQ QFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVES SYGYTFGSGTRLTVVEDLKNGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGQKEVEQNSGP LSVPEGAIASLNCTYSDDRSQSFFWYRQYS GKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQ YVSLLRDSQPSPDSATYLCAAYSGAGSYQL TFGKGTKLSVIPNIQN
--	--	--	--

EJEMPLOS

Los receptores de células T (TCR) nativos contra antígenos asociados a cánceres suelen tener una afinidad más baja que los TCR dirigidos a antígenos virales, y esta puede ser una explicación posible para el escape inmune de los tumores (Aleksic et al., 2012). Por consiguiente, resultaría deseable disponer de variantes de TCR con una afinidad mayor, diseñadas para usar como construcciones de reconocimiento de antígenos en terapias con células adoptivas o como módulos de reconocimiento en abordajes solubles, es decir, con moléculas biespecíficas (Hickman et al., 2016). Por lo tanto, esta invención

está relacionada con la modificación y la optimización del receptor de células T R4P3F9 (SEQ ID N° 2 y 10) natural, que se dirige al péptido asociado a tumores COL6A3-002 (SEQ ID N° 1) con una afinidad de aproximadamente 60 μ M (DE102016115246).

Ejemplo 1. Generación de un scTv estable

En la presente invención, el TCR R4P3F9 (SEQ ID N° 2 y 10) investigado con anterioridad se convirtió en una construcción de TCR de cadena simple (scTv, SEQ ID N° 22) para realizar una maduración con una presentación en la superficie de una levadura mediante la combinación de dominios variables alfa (SEQ ID N° 4) y beta (SEQ ID N° 12), con la adición de los dominios constantes correspondientes (SEQ ID N° 9 y 17) y una secuencia conectora apropiada de glicina-serina. El ADN de la secuencia correspondiente se sintetizó y se usó para transformar *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (MATa AGA1::GAL1 AGA1::URA3 ura3 52 trp1 leu2 delta200 his3 delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL) (ATCC® MYA 4941™), junto con un vector para la visualización en levaduras que contenía una secuencia de guía y la proteína de apareamiento para levaduras Aga2p (SEQ ID N° 20), basada en pCT302 (Boder et al., 2000). La proteína de fusión obtenida después de la recombinación homóloga en la levadura (SEQ ID N° 19) contenía un péptido de guía en el extremo N de una proteína Aga2p para visualizar la proteína de interés (Boder et al., 1997), péptidos marcadores cortos con secuencias conectoras (SEQ ID N° 21 y 23) para controlar la expresión y la proteína de interés, es decir, scTv R4P3F9 (SEQ ID N° 22) o sus variantes. La transformación se realizó según se describe en DE102016121899 y dio como resultado hasta 10⁹ clones de levadura por

biblioteca. Las bibliotecas fueron generadas mediante una PCR con mutaciones aleatorias que abarcó toda la secuencia génica del scTv R4P3F9.

El proceso para seleccionar los clones de levadura con el mejor nivel de expresión del scTv que podía unirse selectivamente a COL6A3-002 en el contexto de HLA-A*02 se realizó esencialmente según se describe en Smith et al., 2015. Para determinar la expresión elevada y la conformación correcta de la variante del scTv R4P3F9 presentada en la superficie de la levadura, se usó un anticuerpo anti-Vbeta1 (Beckman Coulter, clon BL37.2) junto con el tetrámero HLA-A*02/COL6A3-002 (figura 1). Como resultado de la conversión del scTv en la superficie de la levadura, se produjeron dos mutaciones de estabilización cruciales en la región del marco, junto con las secuencias CDR originales para la presentación correcta del scTv en la superficie celular, bQ43K (SEQ ID N° 24) y bL72S (SEQ ID N° 25), ambas localizadas en la cadena beta. Además, durante la maduración para la estabilidad, la posición 29 en la CDR1 de la cadena alfa (SEQ ID N° 5) se convirtió de glicina en arginina (mutante 1 de CDRa1, SEQ ID N° 26), lo que dio como resultado una mejor unión al tetrámero.

Ejemplo 2. Maduración por afinidad del scTv estabilizado

Para generar moléculas de scTv con una mayor afinidad de unión por HLA-A*02/COL6A3-002, se degeneró CDRb1 (SEQ ID N° 13) usando el andamiaje estabilizado identificado previamente del scTv R4P3F9S (SEQ ID N° 27) para expresar las mutaciones de estabilización aG29R, bQ43K y bL72S. Los residuos de CDRb1 se asignaron al azar usando oligonucleótidos de ADN degenerados, esencialmente como se describió con anterioridad (Smith et al., 2015). La biblioteca de ADN resultante se usó en una transformación como se describió en el ejemplo 1. Para retener la selectividad de la unión al scTv, se empleó una

selección negativa contra tetrámeros HLA-A*02 que comprendían péptidos derivados de tejidos normales (SEQ ID N° 28 a 36), cuyas secuencias eran altamente similares a la del péptido COL6A3-002.

Para seleccionar las variantes del scTv R4P3F9S con una afinidad y una selectividad mejoradas, se usó una concentración decreciente del tetrámero HLA-A*02/COL6A3-002 en cada proceso de clasificación. Después de tres procesos de selección, se aislaron y se secuenciaron clones de scTv individuales para proveer diversas secuencias de CDRb1 maduras por afinidad (SEQ ID N° 37 a 49). Se observó que los scTv con secuencias CDRb1 maduras pudieron unirse mucho mejor a COL6A3-002, mientras que su selectividad por COL6A3-002 no se vio afectada, ya que no pudieron unirse a 9 péptidos similares (figura 2).

Ejemplo 3. Producción de proteínas de fusión con scTv y anticuerpos biespecíficos

Pueden expresarse scTv contra HLA-A*02/COL6A3-002 estabilizados y madurados por afinidad en fusiones con anticuerpos dirigidos contra CD3 para realizar una guía específica a los tumores y activar las células T independientemente de su especificidad natural. Los inventores generaron proteínas de fusión con TCR y anticuerpos biespecíficos que comprendían una cadena pesada Fab (UCHT1) anti-CD3 (SEQ ID N° 51) fusionada con variantes de scTv R4P3F9S (SEQ ID N° 50, 64, 65 y 66) y una cadena liviana Fab anti-CD3 (UCHT1) (SEQ ID N° 52). Las proteínas de fusión Fab-scTv resultantes, que tuvieron una masa molecular de aproximadamente 75 kDa y comprendieron diversas secuencias CDR1 de las cadenas alfa (SEQ ID N° 5 y 26) y beta (SEQ ID N° 13 y 37 a 49) del scTv R4P3F9S para proveer diversas variantes de

fusiones Fab-scTv (75-1 a 75-25, tabla 2), se expresaron en células ExpiCHO transfectadas transitoriamente, según lo recomendado por el fabricante. Las proteínas se purificaron usando la proteína L y una cromatografía de exclusión por tamaño. Todas las variantes de fusión pudieron producirse con rendimientos de entre 80 µg y 1 mg (tabla 2), y los heterodímeros se formaron homogéneamente y tuvieron el tamaño esperado, según lo determinado mediante una cromatografía de exclusión por tamaño (figura 3).

Tabla 2. Nomenclatura y rendimiento de las proteínas de fusión Fab-scTv biespecíficas: las moléculas se basaron en SEQ ID N° 50 y 52 y las variantes indicadas de CDRa1 y CDRb1

Variante	CDRa1/SEQ ID N°	CDRb1/SEQ ID N°	Rendimiento (µg)
75-1	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	RSGDLS (SEQ ID N° 13)	267,9
75-2	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ARWHNN (SEQ ID N° 37)	78,4
75-3	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	AKDHLN (SEQ ID N° 38)	646,7
75-4	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ARWHRN (SEQ ID N° 39)	704,3
75-5	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	AMDHPY (SEQ ID N° 40)	397,2
75-6	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ATDHYN (SEQ ID N° 41)	268,1
75-7	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ARYHTN (SEQ ID N° 42)	83,2
75-8	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	APYHLN (SEQ ID N° 43)	765,7
75-9	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	AKDHTN (SEQ ID N° 44)	1067,2
75-10	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	RSGDLS (SEQ ID N° 13)	389,6
75-11	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARWHNN (SEQ ID N° 37)	270,4
75-12	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	AKDHLN (SEQ ID N° 38)	943,6
75-13	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARWHRN (SEQ ID N° 39)	560,3

75-14	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	AMDHPY (SEQ ID N° 40)	360,7
75-15	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ATDHYN (SEQ ID N° 41)	541,5
75-16	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARYHTN (SEQ ID N° 42)	403,6
75-17	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	APYHLN (SEQ ID N° 43)	195,5
75-18	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	AKDHTN (SEQ ID N° 44)	731,3
75-19	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARYHRN (SEQ ID N° 45)	794
75-20	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARWHSN (SEQ ID N° 46)	85,5
75-21	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ATDHYN (SEQ ID N° 47)	276
75-22	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	RWGD LN (SEQ ID N° 48)	255
75-23	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARDHLN (SEQ ID N° 49)	217
75-24 ^a	DRGSQS (SEQ ID NO: 5)	RSGDLS (SEQ ID N° 13)	166,6
75-25 ^a	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	RSGDLS (SEQ ID N° 13)	267

^aorientación beta-alfa del scTv

Ejemplo 4. Unión de una proteína de fusión Fab-scTv a COL6A3-002 y péptidos similares

La afinidad de unión de proteínas de fusión anti-CD3-scTv R4P3F9S a monómeros HLA-A*02 con COL6A3-002 o péptidos similares se determinó mediante una interferometría en biocapas. Las mediciones se realizaron en un sistema Octet RED384, usando las configuraciones recomendadas por el fabricante. En resumen, las moléculas Fab-scTv purificadas se cargaron en biosensores (FAB2G) antes de analizar series de diluciones de HLA-A*02/COL6A3-002. En comparación con las variantes 75-1 y 75-24, que comprendían CDRa1 y CDRb1 salvajes, se obtuvieron afinidades de unión hasta 40 veces mayores con las variantes de Fab-scTv con secuencias CDRb1 y/o CDRa1 maduras (tabla 3, figura 4). Para evaluar la selectividad de la unión a

HLA-A*02/COL6A3-002, se evaluó la unión entre moléculas Fab-scTv purificadas cargadas en biosensores FAB2G y péptidos similares (SEQ ID N° 28 a 36) 1 μ M, cada uno en un complejo con HLA-A*02. Con la excepción de VHLA-A*02/COL6A1-001 (SEQ ID N° 30), que se unió a la mayoría de las variantes de Fab-scTv que contenían CDRa1 madurada (SEQ ID N° 26), las variantes de Fab-scTv no se unieron a los péptidos similares (figura 5): una indicación de una selectividad de unión alta. Para algunas variantes de Fab-scTv, se analizó la ventana terapéutica entre HLA-A*02/COL6A3-002 y HLA-A*02/COL6A1-001 cargando complejos de péptidos-HLA biotinilados en biosensores (SA) y analizando series de diluciones de las variantes de Fab-scTv. Si bien la variante 75-10, que comprendía CDRa1 madurada (SEQ ID N° 26) y CDRb1 salvaje (SEQ ID N° 13), presentó una afinidad de unión por HLA-A*02/COL6A3-002 que fue 8 veces la que presentó por HLA-A*02/COL6A1-001, se detectó una afinidad de unión de hasta 57 veces para la variante de Fab-scTv 75-13, que comprendía una CDRb1 madurada (SEQ ID N° 39): una indicación de una mejora en la ventana terapéutica (tabla 4, figura 6).

Tabla 3. Afinidad de unión de proteínas de fusión Fab-scTv a HLA-A*02/COL6A3-002

Variante	K _D (M)	k _{activación} (1/Ms)	k _{desactivación} (1/s)
75-1	8,06E-06	1,01E+05	8,17E-01
75-2	3,69E-06	1,59E+05	5,86E-01
75-3	4,92E-06	9,71E+04	4,78E-01
75-4	5,76E-06	9,78E+04	5,63E-01
75-5	4,32E-04	2,21E+03	9,55E-01
75-6	1,13E-06	2,06E+05	2,32E-01

75-7	1,79E-06	1,93E+05	3,44E-01
75-8	3,45E-06	1,36E+05	4,69E-01
75-9	1,41E-05	6,02E+04	8,51E-01
75-10	1,78E-06	1,69E+05	3,01E-01
75-11	2,82E-07	4,16E+05	1,18E-01
75-12	3,74E-07	2,67E+05	1,00E-01
75-13	4,05E-07	3,28E+05	1,33E-01
75-14	3,10E-06	8,41E+04	2,61E-01
75-15	7,78E-07	2,33E+05	1,81E-01
75-16	5,87E-07	3,37E+05	1,98E-01
75-17	2,27E-07	3,62E+05	8,20E-02
75-18	1,93E-06	1,51E+05	2,91E-01
75-19	6,00E-07	2,96E+05	1,78E-01
75-20	5,31E-07	6,08E+05	3,23E-01
75-21	5,52E-07	2,72E+05	1,50E-01
75-22	8,22E-07	2,48E+05	2,04E-01
75-23	3,24E-07	3,18E+05	1,03E-01
75-24	5,20E-06	1,08E+05	5,62E-01
75-25	8,33E-06	6,23E+04	5,19E-01

Tabla 4. Unión comparativa de una combinación de proteínas de fusión

Fab-scTv a HLA-A*02/COL6A3-002 y HLA-A*02/COL6A1-001

Variante	pHLA-A*02	K _D (M)	KD _{COL6A1-001} /KD _{COL6A3-002}
75-10	COL6A3-002	1,37E-05	8
	COL6A1-001	1,08E-04	
75-11	COL6A3-002	8,50E-07	8

	COL6A1-001	6,46E-06	
75-12	COL6A3-002	7,24E-07	12
	COL6A1-001	8,98E-06	
75-13	COL6A3-002	7,39E-07	57
	COL6A1-001	4,23E-05	
75-17	COL6A3-002	8,25E-07	9
	COL6A1-001	7,10E-06	
75-23	COL6A3-002	1,15E-06	22
	COL6A1-001	2,55E-05	

Ejemplo 5. Uso de un TCR madurado por afinidad en la expresión celular

La modificación de células T para expresar TCR que reconocen péptidos específicos de tumores-HLA es una alternativa prometedora para redirigir las células T a las células cancerosas. Debido a que al usarse secuencias CDR1 maduras podrían mejorarse los TCR unidos a células contra HLA-A*02/COL6A3-002, se injertaron las secuencias mutadas identificadas para CDRa1 y CDRb1 en el TCR R4P3F9 original (SEQ ID N° 2 y 10). Las variantes mutadas resultantes de los TCR (C-1 a C-18, tabla 5) se expresaron en células T CD8⁺ humanas después de electroporar el ARNm correspondiente, generado mediante la transcripción in vitro de construcciones de ADN amplificadas por PCR. Como control, se expresó el TCR 1G4 (SEQ ID N° 53 y 57) contra el péptido NYESO1-001 (SEQ ID N° 61). Después de incubar las células T CD8⁺ electroporadas con el ARN durante la noche, se analizó la expresión de las variantes de TCR introducidas mediante una coloración con tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002 marcados con PE o tetrámeros HLA-A*02/NYESO1-001. Si

bien la variante del TCR R4P3F9 original C-1 presentó una coloración mínima con los tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002, las variantes del TCR R4P3F9 C-2 a C-18, con CDRa1 y/o CDRb1 maduras, presentaron una coloración mayor (figura 7). Se evaluó la activación funcional de células T CD8⁺ (20000 células/cavidad) donde se expresaban diversas variantes maduras del TCR R4P3F9 en función del nivel de IFN-gamma liberado en un cultivo concurrente con células T2 (20000 células/cavidad), junto con una serie de diluciones de COL6A3-002 (SEQ ID N° 1) o COL6A3-002 y péptidos similares (SEQ ID N° 28 a 36) 10 µM. En comparación con la variante del TCR R4P3F9 original, las variantes de TCR maduras C-2 a C-18 indujeron una mayor liberación de IFN-gamma, donde el nivel máximo se alcanzó con las concentraciones de péptidos más bajas (figura 8). Según se había esperado, no se observó liberación de IFN-gamma desde las células T donde no se expresaban TCR o donde se expresaba el TCR control 1G4 con especificidad por NYESO1-001. Para analizar la selectividad del reconocimiento de COL6A3-002 de las variantes de TCR R4P3F9 maduras, se determinó la liberación de IFN-gamma en respuesta a células T2 cargadas con péptidos similares (SEQ ID N° 28 a 36) y se obtuvieron diversos perfiles de selectividad para las variantes maduras del TCR R4P3F9. Vale destacar que las variantes del TCR C-5 (SEQ ID N° 62 y 2) y C-14 (SEQ ID N° 62 y 63), que comprendían la misma CDRb1 madurada (SEQ ID N° 40), no reaccionaron transversalmente con COL6A1-001 ni otros péptidos similares (figura 9), por lo que se trataría de las candidatas más prometedoras para la guía a células tumorales basada en TCR.

Tabla 5. Nomenclatura de variantes de TCR celulares: las moléculas se basan en SEQ ID N° 2 y 10 y las variantes indicadas de CDRa1 y CDRb1

Variante	CDRa1	CDRb1
C-1	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	RSGDLS (SEQ ID N° 13)
C-2	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ARWHNN (SEQ ID N° 37)
C-3	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	AKDHLN (SEQ ID N° 38)
C-4	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ARWHRN (SEQ ID N° 39)
C-5	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	AMDHPY (SEQ ID N° 40)
C-6	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ATDHYN (SEQ ID N° 41)
C-7	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	ARYHTN (SEQ ID N° 42)
C-8	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	APYHLN (SEQ ID N° 43)
C-9	DRGSQS (SEQ ID N° 5)	AKDHTN (SEQ ID N° 44)
C-10	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	RSGDLS (SEQ ID N° 13)
C-11	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARWHNN (SEQ ID N° 37)
C-12	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	AKDHLN (SEQ ID N° 38)
C-13	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARWHRN (SEQ ID N° 39)
C-14	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	AMDHPY (SEQ ID N° 40)
C-15	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ATDHYN (SEQ ID N° 41)
C-16	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	ARYHTN (SEQ ID N° 42)
C-17	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	APYHLN (SEQ ID N° 43)
C-18	DRRSQS (SEQ ID N° 26)	AKDHTN (SEQ ID N° 44)

Ejemplo 6. Ventana de reconocimiento de COL6A3-002 y COL6A1-001 de variantes de TCR celulares

La expresión celular y el análisis de las variantes de R4P3F9 se realizaron como se describió con anterioridad. En experimentos anteriores (figura 7), se había comprobado que la coloración de las células T donde se expresaban las variantes del TCR R4P3F9 C-2 a C-18 con tetrámeros HLA-A*02/COL6A3-002

marcados con PE era mayor que la que se había obtenido con el TCR original C-1. Además, las variantes de TCR C-12 y C-17 se habían unido a HLA-A*02/COL6A1-001 (figura 10). Mediante la expresión de todas las variantes de R4P3F9 maduras, se mejoró la activación funcional de las células T CD8⁺ en respuesta a células T2 cargadas con una serie de diluciones de COL6A3-002 (SEQ ID N° 1), con valores de EC₅₀ entre 5 y 90 veces más bajos que el correspondiente al TCR original C-1 (figura 11, tabla 6). El valor de EC₅₀ más bajo se determinó para la variante C-14. Nuevamente, las variantes de TCR C-5 (SEQ ID N° 62 y 2) y C-14 (SEQ ID N° 62 y 63), que comprendían la misma CDRb1 madurada (SEQ ID N° 40), no reaccionaron transversalmente con COL6A1-001, mientras que otras variantes presentaron un reconocimiento fuerte, con ventanas de EC₅₀ (COL6A3-002 versus COL6A1-001) tan bajas como un factor de 5.

Tabla 6. Valores de EC₅₀ (nM) para la liberación de IFN-γ desde células T donde se expresaban variantes de R4P3F9 después de un cultivo concurrente con células T2 cargadas con COL6A3-002 o COL6A1-001

Variante	EC ₅₀ para COL6A3-002 (nM)	EC ₅₀ para COL6A1-001 (nM)
C-1	2,51	-
C-2	0,16	-
C-3	0,14	871 ^a
C-4	0,13	-
C-5	0,15	-
C-6	0,48	-
C-7	0,29	-
C-8	0,20	350

C-9	0,55	-
C-10	0,32	1,5
C-11	0,32	8,2
C-12	0,20	1,9
C-13	0,23	9,7
C-14	0,03	-
C-15	0,31	69
C-16	0,34	78
C-17	0,33	4,1
C-18	0,14	280089 ^a

^ameseta no alcanzada

Ejemplo 7. Eficacia de las variantes de R4P3F9 maduras C-5 y C-14 en líneas de células tumorales

La expresión celular y el análisis de las variantes de R4P3F9 se realizaron como se describió con anterioridad.

Mediante la expresión de las variantes de R4P3F9 maduras C-5 (SEQ ID N° 62 y 2) y C-14 (SEQ ID N° 62 y 63), se mejoró la activación funcional de células T CD8⁺ en respuesta a líneas de células tumorales presentadoras de COL6A3-002 (SEQ ID N° 1), en comparación con el TCR original C-1 (figura 12). Las líneas de células tumorales usadas durante este estudio presentaron diferentes cantidades del péptido blanco. Las células SF539 comprendían aproximadamente 4000 copias de HLA-A*02/COL6A3-002 cada una, y las células SW982 comprendían aproximadamente 460 copias cada una. Si bien el TCR original C-1 no medió una activación fuerte de las células T después de un cultivo concurrente con líneas de células positivas para el blanco, la variante del

TCR C-14 dio como resultado una activación funcional incluso superior a la que se obtuvo con la variante del TCR C-5. Estos resultados concuerdan con las mejoras en la EC_{50} de los TCR C-5 y C-14 con relación a C-1 (tabla 6). La línea de células tumorales negativa para el blanco MCF-7 no fue reconocida por ninguno de estos TCR.

REFERENCIAS

Aleksic et al., 2012, Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors – implications for therapeutic strategies, Eur. J. Immunol., Diciembre de 2012, 42(12):3174-9

Hickman et al., 2016, Antigen Selection for Enhanced Affinity T-Cell Receptor-Based Cancer Therapies, J. Biomol. Screen., Septiembre de 2016, 21(8):769-85

Boder y Wittrup, 2000, Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, Methods Enzymol., 2000, 328:430-44

Boder y Wittrup 1997, Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries, Nat. Biotechnol., Junio de 1997, 15(6):553-7

Smith et al., 2015, T Cell Receptor Engineering and Analysis Using the Yeast Display Platform, Methods Mol. Biol., 2015, 1319:95-141

DE102016121899.5

DE102016115246