

RECEPTOR DE CÉLULAS T RESTRINGIDO POR HLA DE LA CLASE I
CONTRA RAS CON MUTACIÓN G12D

REFERENCIA CRUZADA CON UNA SOLICITUD RELACIONADA

5 [0001] Esta solicitud de patente reclama el
beneficio de la Solicitud de Patente Provisional
Estadounidense No. 62/975,544, presentada el 12 de febrero de
2020, la cual se incorpora como referencia en su totalidad en
la presente.

10 **DECLARACIÓN CON RESPECTO A INVESTIGACIÓN O DESARROLLO**
PATROCINADO FEDERALMENTE

 [0002] Esta invención se hizo con apoyo del
Gobierno bajo el número de proyecto ZIABC010984 por los
Institutos Nacionales de Salud, Instituto Nacional del
15 Cáncer. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre esta
invención.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA DE MATERIAL PRESENTADO
ELECTRÓNICAMENTE

 [0003] Incorporada como referencia en su totalidad
20 en la presente se encuentra un listado de secuencias de
nucleótidos/aminoácidos legible por computadora presentado
concurrentemente con la presente e identificado como sigue:
Un archivo (de Texto) ASCII de 114,961 Bits llamado
"751506_ST25.txt," fechad el 29 de enero de 2021.

25 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0004] Algunos cánceres pueden tener opciones de tratamiento muy limitadas, particularmente cuando el cáncer se vuelve metastásico e inoperable. A pesar de los avances en tratamientos como, por ejemplo, cirugía, quimioterapia y
5 terapia de radiación, el pronóstico para muchos cánceres, como, por ejemplo, los cánceres pancreático, colorrectal, de pulmón, endometrial, ovario y próstata, puede ser pobre. En consecuencia, existe una necesidad no satisfecha de tratamientos adicionales para el cáncer.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

[0005] Una modalidad de la invención proporciona un receptor de células T (TCR) aislado o purificado que comprende las secuencias de aminoácidos (a) SEQ ID NOs: 1-3, (b) SEQ ID NOs: 4-6 o (c) SEQ ID NOs: 1-6, donde el TCR tiene
15 especificidad antigénica por una secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico, presentado por una molécula de la Clase I de antígeno leucocitario humano (HLA), donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una
20 secuencia de aminoácidos de un homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kristen (KRAS) humana mutada, un homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Harvey (HRAS) humana mutada o un homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Neuroblastoma (HRAS) humana mutada y donde la posición 12 se
25 define con referencia a proteína KRAS humana natural, HRAS

humana natural o NRAS humana natural, respectivamente.

[0006] Otra modalidad de la invención proporciona un polipéptido aislado o purificado que comprende una porción funcional del TCR de la invención, donde la porción funcional
5 comprende las secuencias de aminoácidos de: (a) todas de las SEQ ID NOs: 1-3, (b) todas de las SEQ ID NOs: 4-6 o (c) todas de las SEQ ID NOs: 1-6.

[0007] Otra modalidad más de la invención proporciona una proteína aislada o purificada, que comprende
10 una primera cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-3 y una segunda cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4-6.

[0008] Las modalidades de la invención proporcionan además ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes,
15 células anfitrionas, poblaciones de células y composiciones farmacéuticas relacionadas con los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención.

[0009] Una modalidad de la invención proporciona un
20 ácido nucleico aislado o purificado que comprende, de 5' a 3', una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de nucleótidos, donde la primera y segunda secuencia de nucleótidos, respectivamente, codifica para las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 7 y 8; 51 y 8; 7
25 y 52; 51 y 52; 8 y 7; 8 y 51; 52 y 7; 52 y 51; 21 y 22; 53 y

22; 21 y 54; 53 y 54; 22 y 21; 22 y 53; 54 y 21; 54 y 53; 23
 y 24; 55 y 24; 23 y 56; 55 y 56; 24 y 23; 24 y 55; 56 y 23;
 56 y 55; 32 y 33; 33 y 32; 59 y 60; 60 y 59; 34 y 35; 35 y
 34; 61 y 62; 62 y 61; 36 y 37; 37 y 36; 63 y 64; 64 y 63; 40
 5 y 41; 57 y 41; 40 y 58; 57 y 58; 41 y 40; 41 y 57; 58 y 40;
 58 y 57; 42 y 43; 43 y 42; 65 y 66; o 66 y 65.

[0010] Los métodos de detección la presencia de
 cáncer en un mamífero, métodos de tratamiento o prevención
 del cáncer en un mamífero, métodos de inducción de una
 10 respuesta inmune contra un cáncer en un mamífero, métodos de
 producción de una célula anfitriona que expresa un TCR que
 tiene especificidad antigénica por el péptido de VVVGADGVGK
 (SEQ ID NO: 29) y métodos de producción de los TCR,
 polipéptidos y proteínas de la invención, son proporcionados
 15 adicionalmente por las modalidades de la invención.

[0011] Las modalidades adicionales son como se
 describe en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012] Figuras 1A-1B: detección de TIL para la
 20 reactividad con KRAS G12D. La Figura 1A es una gráfica que
 muestra la medición ELISPOT de la secreción de IFN- γ (número
 de puntos por 3e4 células). La Figura 1B es una gráfica que
 muestra los resultados del ensayo de citometría de flujo de
 la expresión de 4-1BB y OX40 (% 4-1BB+/OX40+) medida después
 25 del cocultivo de células efectoras con células objetivo. Las

células efectoras fueron TIL de los fragmentos tumorales F4, F5, F6, F8, F9 y F10 del Paciente 4373. Las células objetivo (DC autólogas) fueron electroporadas con ARNm con minigen en tándem (TMG) que codifica para las mutaciones 12 RAS (G12D-
 5 G12V- G12C- G12A- G12S-G13D- G13R- G13V-Q61R- Q61L- Q61K- Q61H) (SEQ ID NO: 49) (círculos abiertos) o la secuencia (SEQ ID NO: 48) de los epítomos de RAS naturales (WT) (WT G12+G13+Q61) (círculos abiertos); DC autólogas cargadas con péptido largo (LP) de G12 WT (MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI) (SEQ
 10 ID NO: 27) (cuadros sombreados); G12D Mut LP (MTEYKLVVVGADDGVGKSALTIQLI) (SEQ ID NO: 26) (cuadros abiertos); o epítomo mínimo (ME) A11/A02 - mezcla de concentraciones iguales de tres secuencias peptídicas: KLVVVGADGV (SEQ ID NO: 50), VVGADGVGK (SEQ ID NO: 28),
 15 VVVGADGVGK (SEQ ID NO: 29) (triángulos sombreados). Como controles negativos, se cocultivaron células DC autólogas solas (solo TIL) (diamantes) o cocultivadas con: dimetil sulfóxido (DMSO) (triángulos abiertos). Como control positivo, las TIL crecen en presencia de material Dynabeads
 20 anti-CD3/anti-CD28 (ThermoFisher) (estrellas).

[0013] La Figura 2 es una gráfica que muestra el porcentaje de células que expresa 4-1BB y OX40 después del cocultivo de las células efectoras con células objetivo. Las células efectoras fueron PBL autólogos del Paciente 4373
 25 transducidas con (i) una de dos secuencias de TCR (TCR1 o

TCR2) obtenidas por un método de secuenciamiento de una sola célula de TIL reactivas (mostradas en la Figura 1) que se sospechaba eran reactivas con RAS G12D o (ii) HLA-A11 restringido, TCR anti-KRAS G12D murino (control positivo) (mTCR) o (iii) PBL no transducida (-). Las células objetivo fueron: línea celular COS HLA-A2 (círculos abiertos), línea celular COS HLA-A2-G12D (círculos cerrados), línea celular COS HLA-A11 (triángulos abiertos) o línea celular COS HLA-A11-G12D (triángulos abiertos) o células T únicamente (sin células objetivo) (-).

[0014] Figuras 3A-3B: PBL transducidas con TCR 4373 probadas por la reactividad con KRAS G12D. La Figura 3A es una gráfica que muestra la medición ELISPOT de la secreción de IFN- γ (número de puntos por 3e4 células). La Figura 3B es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de citometría de flujo de la expresión 4-1BB y OX40 (% 4-1BB+/OX40+) de células CD8 activadas medidas después del cocultivo de las células efectoras con células objetivo. Las células efectoras fueron CD8+ PBL autólogos del Paciente 4373 transducidas con el vector de expresión retroviral que codifica (i) los TCR 4373 1 y 2 que se sospechan son reactivos con RAS G12D (con regiones variables humanas); (ii) el HLA-A11 restringido, TCR anti-KRAS G12D murino del Ejemplo 1; o (iii) proteína fluorescente verde (GFP) (control). Las células transducidas con un vector vacío sirvieron como

control adicional (Mock Td). Las células objetivo eran células dendríticas (DC) autólogas transfectadas con ARNm de longitud completa (FL) que han sido cualquiera del gen WT KRAS (círculos abiertos) o gen de la mutación FL KRAS G12D (círculos cerrados); DC autólogas cargadas con péptido que ha sido WT KRAS LP (triángulo abierto) o, G12D Mut KRAS LP (triángulos cerrados) o cargadas con el epítipo mínimo (ME) de KRAS: ME A02 WT (diamantes abiertos); ME A02 G12D (diamantes cerrados); mezcla ME HLA-A11 WT (cuadros abiertos); o mezclas ME HLA-A11 G12D (cuadros cerrados). Como control, las células transducidas se cultivaron solas (células T únicamente) (asterisco) o se cultivaron con DMSO (estrellas) o material Dynabeads anti-CD28/anti-CD3 (hexágonos).

[0015] Figuras 4A-4C: Prueba de Avidéz de TCR contra DC autólogas cargadas con titulación de ME: La Figura 4A es una gráfica que muestra los resultados de la secreción de IFN- γ del ELISPOT (número de puntos por 3e4 células). Las Figuras 4B y 4C son gráficas que muestran los resultados del ensayo de citometría de flujo de la expresión 4-1BB y OX40 (% 4-1BB+/OX40+) (4B) para PBL positivas a mTCR activadas con CD8 y CD4 (4C), medidas después del cocultivo de las células efectoras con células objetivo. Las células efectoras eran PBL autólogos del Paciente 4373 transducidas con un vector de expresión retroviral que codifica para TCR 4373 reactivo con

RAS G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas). Las células objetivo eran DC autólogas del Paciente 4373 cargadas con los siguientes péptidos a las concentraciones mostradas: péptido del epítipo mínimo mutado con 10 residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) (círculos abiertos) o un péptido de epítipo mínimo de WT con 10 residuos de aminoácido (VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31) (círculos cerrados).

[0016] Figuras 5A-5C: Prueba de Aidez de TCR contra la línea celular COS-A11 autóloga cargada con titulación de ME: La Figura 5A es una gráfica que muestra los resultados de la secreción de IFN- γ del ELISPOT (número de puntos por 3e4 células). Las Figuras 5B y 5C son gráficas que muestran los resultados del ensayo de citometría de flujo de la expresión de 4-1BB y OX40 (% 4-1BB+/OX40+) PBL positivas a mTCR activadas con CD8 (5B) y CD4 (5C) medida después del cocultivo de las células efectoras con células objetivo. Las células efectoras eran PBL autólogos del Paciente 4373 transducidas con un vector de expresión retroviral que codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas). Las células objetivo eran DC autólogas del Paciente 4373 cargadas con los siguientes péptidos a las concentraciones mostradas: un péptido de epítipo mínimo mutado con 10 residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) (círculos abiertos) o un péptido de epítipo mínimo de WT con 10 residuos de aminoácido

(VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31) (círculos cerrados).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0017] Las proteínas de la familia RAS pertenecen a la gran familia de GTPasas pequeñas. Sin ser limitados por una teoría o mecanismo particular, se cree que, cuando mutan, las proteínas RAS pueden involucrarse en la transducción de señales de manera temprana en la oncogénesis de muchos cánceres humanos. La sustitución de un solo aminoácido puede activar la proteína. El producto de la proteína RAS mutada puede activarse constitutivamente. Las proteínas RAS mutadas pueden expresarse en cualquiera de una variedad de cánceres humanos como, por ejemplo, cánceres pancreático (por ejemplo, carcinoma pancreático), colorrectal, de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma pulmonar), endometrial, de ovario (por ejemplo, cáncer de ovario epitelial) y de próstata. Las proteínas de la familia RAS humanas incluyen KRAS, HRAS y NRAS.

[0018] La KRAS también se denomina como GTPasa KRas, oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten V-Ki-Ras2 o KRAS2. Existen dos variantes de transcripción de KRAS: la variante A de KRAS y la variante B de KRAS. La variante A de KRAS natural (WT) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. La variante de KRAS WT B tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. Aquí posteriormente, las referencias a "KRAS" (mutada o no mutada (WT)) se refieren a

ambas de la variante A y la variante B, a menos que se especifique otra cosa. Cuando se activa, la KRAS mutada se une a guanosina-5'-trifosfato (GTP) y convierte el GTP a guanosina 5'-difosfato (GDP).

5 [0019] La HRAS es otro miembro de la familia de proteína RAS. La HRAS también denominada Oncoproteína Viral del Sarcoma de Rata de Harvey, Homólogo del Oncogén Viral del Sarcoma de Rata de Harvey V-Ha-Ras o Proteína de Unión de GTP Pequeña de la Familia de Ras H-Ras. La HRAS WT tiene la
10 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

[0020] La NRAS es otro miembro más de la familia de proteína RAS. La NRAS también se denomina como GTPasa NRas, Homólogo del Oncogén Viral de RAS de Neuroblastoma V-Ras o NRAS1. La NRAS WT tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ
15 ID NO: 12.

[0021] Una modalidad de la invención proporciona un TCR aislado o purificado, donde el TCR tiene especificidad antigénica por una secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con
20 ácido aspártico, donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una KRAS humana mutada, una HRAS humana mutada o una secuencia de aminoácidos de NRAS humana mutada y donde la posición 12 se define con referencia a la proteína KRAS humana WT, HRAS humana WT o NRAS humana WT,
25 respectivamente. Aquí posteriormente, la referencia a un

"TCR" también se refiere a porciones funcionales y variantes funcionales del TCR, a menos que se especifique otra cosa.

[0022] La secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada puede ser una secuencia de aminoácidos de KRAS humana mutada, una secuencia de aminoácidos de HRAS humana mutada o una secuencia de aminoácidos de NRAS humana mutada. Las secuencias de aminoácidos de la proteína KRAS, NRAS y HRAS humana WT tienen cada una, una longitud de 188 o 189 residuos de aminoácido y tienen un alto grado de identidad entre sí. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína NRAS humana WT es 86.8% idéntica a la de la proteína KRAS humana WT. Los residuos de aminoácidos 1-86 de la proteína NRAS humana WT y la proteína KRAS humana WT son 100% idénticos. La secuencia de aminoácidos de la proteína HRAS humana WT es 86.3% idéntica a la de la proteína KRAS humana WT. Los residuos de aminoácidos 1-94 de la proteína HRAS humana WT y la proteína KRAS humana WT son 100% idénticos. Aquí posteriormente, la referencia "RAS" (mutada o no mutada (WT)) se refieren colectivamente a KRAS, HRAS y NRAS, a menos que se especifique otra cosa.

[0023] En una modalidad de la invención, la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada comprende una secuencia de aminoácidos de RAS humana con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico, donde la posición 12 se define con referencia a la proteína RAS WT

correspondiente. La proteína RAS WT puede ser cualquiera de la proteína KRAS WT (SEQ ID NO: 9 o 10), proteína HRAS WT (SEQ ID NO: 11) o proteína NRAS WT (SEQ ID NO: 12) debido a que, como se explicó anteriormente, los residuos de aminoácidos 1-86 de la proteína NRAS humana WT y la proteína KRAS humana WT son 100% idénticos y los residuos de aminoácidos 1-94 de la proteína HRAS humana WT y la proteína KRAS humana WT son 100% idénticos. En consecuencia, el residuo de aminoácido en la posición 12 de cada una proteína KRAS WT, HRAS WT y NRAS WT es el mismo, es decir, glicina.

[0024] La secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada tiene una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico. A este respecto, las modalidades de la invención proporcionan TCR con especificidad antigénica por cualquier secuencia de proteínas, polipéptido o aminoácidos peptídicos de RAS humana con una mutación G12D.

[0025] Las mutaciones y sustituciones de RAS se definen aquí con referencia a la secuencia de aminoácidos de la proteína RAS WT correspondiente. De este modo, las mutaciones y sustituciones de RAS se describen aquí con referencia al residuo de aminoácido presente en una posición particular en la proteína RAS WT (es decir, la posición 12), seguido por el número de posición, seguido por el residuo de aminoácido con el cual ha sido reemplazado el residuo en la mutación o sustitución particular abajo discutida. Una

secuencia de aminoácidos de RAS (por ejemplo, un péptido de RAS) puede comprender menos de todos los residuos de aminoácido de la proteína RAS WT de longitud completa. En consecuencia, la posición 12 se define aquí con referencia a la proteína RAS WT de longitud completa (es decir, cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12) comprendiendo que la posición real del residuo correspondiente en un ejemplo particular de una secuencia de aminoácidos de RAS puede ser diferente. Cuando las posiciones son de acuerdo a lo definido por cualquiera de la SEQ ID NO: 9-12, el término "G12" se refiere a la glicina normalmente presente en la posición 12 de cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12 y "G12D" indica que la glicina normalmente presente en la posición 12 de cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12 es reemplazada por ácido aspártico. Por ejemplo, un ejemplo particular de una secuencia de aminoácidos de RAS es, por ejemplo, VVVGAGGVGK (SEQ ID NO: 31) (un péptido de KRAS WT correspondiente a los residuos de aminoácidos contiguos de 7 a 16 de la SEQ ID NO: 9), "G12D" se refiere a una sustitución de la glicina subrayada en la SEQ ID NO: 31 con ácido aspártico, aun cuando la posición real de la glicina subrayada en la SEQ ID NO: 31 es 6. Las secuencias de aminoácidos de RAS humana con la mutación G12D se denominan aquí posteriormente como "RAS G12D".

[0026] Los ejemplos de proteínas RAS de longitud completa con la mutación G12D se exponen en la Tabla 1 más

abajo.

TABLA 1

Proteína RAS de Longitud Completa Mutada	SEQ ID NO:
G12D KRAS variante A	13
G12D KRAS variante B	14
G12D HRAS	15
G12D NRAS	16

[0027] En una modalidad de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por un péptido de RAS con la mutación G12D descrita anteriormente, donde el péptido de RAS G12D tiene cualquier longitud. En una modalidad de la invención, el péptido de RAS G12D tiene cualquier longitud adecuada para unirse a cualquiera de las moléculas HLA de la Clase I descritas en la presente. Por ejemplo, el TCR puede tener especificidad antigénica por un péptido de RAS con la mutación G12D, teniendo el péptido de RAS una longitud de aproximadamente 9 hasta aproximadamente 10 residuos de aminoácido. El péptido de RAS G12D puede comprender cualquier residuo de aminoácido contiguo de la proteína RAS mutada que incluya la mutación G12D. En una modalidad de la invención, el TCR puede tener especificidad antigénica por un péptido de RAS con la mutación G12D, teniendo el péptido RAS mutado una longitud de aproximadamente 9 residuos de aminoácido o aproximadamente 10 residuos de aminoácido. Los ejemplos de péptidos específicos, cada uno con la mutación G12D, que

pueden ser reconocidos por el TCR de la invención son el de 9mérico VVGADDGVGK (SEQ ID NO: 28) y 10mérico VVVGADDGVGK (SEQ ID NO: 29). En una modalidad de la invención, el TCR tiene especificidad antigénica por la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada de la SEQ ID NO: 29. En una modalidad de la invención, el TCR no tiene especificidad antigénica por la secuencia de aminoácidos RAS humana natural de VVGAGGGVGK (SEQ ID NO: 30) o 10mérico VVVGAGGGVGK (SEQ ID NO: 31).

[0028] En una modalidad de la invención, los TCR de la invención son capaces de reconocer la RAS G12D presentada por una molécula HLA de la Clase I. A este respecto, el TCR puede producir una respuesta inmune después de la unión a RAS G12D dentro del contexto de la molécula HLA de la Clase I. Los TCR de la invención son capaces de reconocer RAS G12D que es presentada por una molécula HLA de la Clase I y puede unirse a la molécula HLA de la Clase I además de RAS G12D.

[0029] En una modalidad de la invención, la molécula HLA de la Clase I es una molécula HLA-A. La molécula de HLA-A es un heterodímero de una cadena α y microglobulina β 2. La cadena α de HLA-A puede ser codificada por un gen HLA-A. La microglobulina β 2 se une de manera no covalente a los dominios α 1, α 2 y α 3 de la cadena α para construir el complejo de HLA-A. La molécula HLA-A puede ser cualquier molécula HLA-A. En una modalidad de la invención, la molécula HLA de la Clase I es una molécula HLA-A11. La molécula HLA-

A11 puede ser cualquier molécula HLA-A11. Los ejemplos de moléculas HLA-A11 pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas codificadas por los alelos HLA-A*11:01, HLA-A*11:02, HLA-A*11:03 o HLA-A*11:04. Preferiblemente, la molécula HLA
5 de la Clase I es codificada por el alelo HLA-A*11:01.

[0030] Los TCR de la invención pueden proporcionar cualquiera de una o más de una variedad de ventajas, incluyendo cuando son expresados por células utilizadas para la transferencia celular adoptiva. La RAS G12D es expresada
10 por células cancerosas y no es expresada por células normales no cancerosas. Sin limitarse a una teoría o mecanismo particular, se cree que los TCR de la invención dirigen ventajosamente la destrucción de las células cancerosas minimizando o eliminando a la vez la destrucción de células
15 normales, no cancerosas, reduciendo por lo tanto la toxicidad. Además, debido a que es probable que la mutación G12D ocurra en las etapas iniciales de la tumorigénesis, la mutación RAS G12D puede expresarse sustancialmente sobre todas las células cancerosas de un paciente. Los TCR de la
20 invención pueden, de manera ventajosa, tratar o prevenir exitosamente cánceres positivos a RAS G12D que no respondan a otros tipos de tratamientos como, por ejemplo, quimioterapia, cirugía o radiación. Adicionalmente, los TCR de la invención pueden proporcionar reconocimiento altamente ávido de RAS
25 G12D, lo cual puede proporcionar la capacidad de reconocer

células tumorales no manipuladas. (por ejemplo, células tumorales que no hayan sido tratadas con interferón (IFN)- γ , transfectadas con un vector que codifique para uno o ambos de RAS G12D y HLA-A*11:01, pulsadas con el péptido de RAS G12D o una combinación de las mismas). Las mutaciones de KRAS se encuentran en aproximadamente 70% del cáncer pancreático, 36% del cáncer colorrectal y 20% del cáncer tumoral. Muy comúnmente, las mutaciones ocurren en el codón 12 (que codifica para glicina, G). La mutación G12D de KRAS se encuentra en aproximadamente 36% y aproximadamente 12% de los pacientes con cánceres pancreático y colorrectal, respectivamente. Además, el alelo HLA-A*11:01 se expresa en aproximadamente 14% y aproximadamente 9% de las etnias caucásica e hispanas, respectivamente. El alelo HLA-A*11:01 se expresa hasta en 45% de la etnia asiática en los Estados Unidos. En consecuencia, los TCR de la invención pueden incrementar el número de pacientes con cáncer elegibles para inmunoterapia para incluir aquellos pacientes que expresen el alelo HLA-A*11:01 que pueden ser elegibles para inmunoterapia utilizando TCR que reconozcan la RAS presentada por otras moléculas MHC. Además, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención comprenden la región determinante de complementariedad (CDR) humana y secuencias de aminoácido de la región variable, lo cual puede reducir el riesgo de rechazo por el sistema inmune humano en comparación con, por

ejemplo, TCR, polipéptidos y proteínas que comprenden CDR y secuencias de aminoácidos de la región variable de ratón.

[0031] La frase "especificidad antigénica", como se usa en la presente, significa que el TCR puede unirse específicamente a y reconocer inmunológicamente a RAS G12D con alta avidez. Por ejemplo, puede considerarse que el TCR tiene "especificidad antigénica" por la RAS G12D si aproximadamente 1×10^4 hasta aproximadamente 1×10^5 células T que expresan el TCR secretan al menos aproximadamente 200 pg/mL o más (por ejemplo, 200 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, 5000 pg/mL o más, 7000 pg/mL o más, 10,000 pg/mL o más, 20,000 pg/mL o más o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores) de IFN- γ después del cocultivo con (a) células objetivo negativas al antígeno, positivas a la molécula HLA de la Clase I pulsadas con una baja concentración de péptido de RAS G12D (por ejemplo, aproximadamente 0.05 ng/mL hasta aproximadamente 10 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL, 8 ng/mL, 10 ng/mL o un intervalo definido por cualquiera de los dos valores anteriores) o (b) células objetivo negativas al antígeno, positivas para la molécula HLA de la Clase I, en las cuales se ha introducido una secuencia de nucleótidos que codifica para RAS G12D de modo que la célula objetivo exprese RAS G12D. Las células que expresan los TCR de la invención

también pueden secretar IFN- γ después del cocultivo con células objetivo negativas al antígeno, positivas a las moléculas HLA de la Clase I, pulsadas con concentraciones más altas del péptido de RAS G12D. La molécula HLA de la Clase I
5 puede ser cualquier molécula HLA de la Clase I descritas en la presente (por ejemplo, una molécula HLA-A*11:01).

[0032] De manera alternativa o adicional, puede considerarse que un TCR tiene "especificidad antigénica" por RAS G12D si las células T que expresan el TCR secretan al
10 menos dos veces (por ejemplo, cinco veces) tanto IFN- γ después del cocultivo con (a) células objetivo negativas al antígeno, positivas a la moléculas HLA de la Clase I pulsadas con una baja concentración de péptido de RAS G12D o (b) células objetivo negativas al antígeno, positivas a la
15 molécula HLA de Clase I, en las cuales se ha introducido una secuencia de nucleótidos que codifica para RAS G12D de modo que la célula objetivo exprese RAS G12D en comparación con la cantidad de IFN- γ expresada por un control negativo. El control negativo puede ser, por ejemplo, (i) células T que
20 expresan el TCR, cocultivadas con (a) células objetivo negativas al antígeno, positivas a la molécula HLA de la Clase I, pulsadas con la misma concentración de un péptido irrelevante (por ejemplo, algún otro péptido con una secuencia diferente de la del péptido de RAS G12D) o (b)
25 células objetivo negativas al antígeno, positivas a la

molécula HLA de la Clase I, en las cuales se ha introducido una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido irrelevante de modo que la célula objetivo exprese el péptido irrelevante o (ii) células T no transducidas (por ejemplo, derivadas de PBMC, las cuales no expresan el TCR) cocultivadas con (a) células objetivo negativas al antígeno, positivas a la molécula HLA de la Clase I, pulsadas con la misma concentración de péptido de RAS G12D o (b), células objetivo negativas al antígeno, positivas a la molécula HLA de la Clase I en las cuales se ha introducido una secuencia de nucleótidos que codifica para RAS G12D de modo que la célula objetivo exprese RAS G12D. La molécula HLA de la Clase I expresada por las células objetivo del control negativo sería la misma molécula HLA de la Clase I expresada por las células objetivo que son cocultivadas con las células T que se están siendo probadas. La molécula HLA de la Clase I puede ser cualquier molécula de la HLA Clase I descrita en la presente (por ejemplo, una molécula HLA-A*11:01). La secreción de IFN- γ puede medirse por métodos conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA).

[0033] De manera alternativa o adicional, puede considerarse que un TCR tiene "especificidad antigénica" por RAS G12D si al menos dos veces (por ejemplo, cinco veces) el número de células T que expresan IFN- γ secretado por TCR

después del cocultivo con (a) células objetivo negativas al antígeno, positivas a la molécula HLA de la Clase I, con una concentración baja de péptido de RAS G12D o (b) células objetivo negativas al antígeno, positivas a la molécula HLA de la Clase I, en las que se ha introducido una secuencia de nucleótidos que codifica para RAS G12D de modo que la célula objetivo exprese RAS G12D en comparación con el número de células T de control negativas que secretan IFN- γ . La molécula HLA de la Clase I, la concentración de péptido y el control negativo pueden ser como se describe en la presente con respecto a otros aspectos de la invención. Los números de células que secretan IFN- γ puede medirse por métodos conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, ELISPOT.

[0034] De manera alternativa o adicional, puede considerarse que un TCR tiene "especificidad antigénica" por RAS G12D si las células T que expresan la expresión sobrerregulada de TCR de uno o más marcadores de activación de células T de acuerdo a lo medido, por ejemplo, citometría de flujo después de la estimulación con células objetivo que expresan RAS G12D. Los ejemplos de marcadores de activación de células T incluyen 4-1BB, OX40, CD107a, CD69 y citocinas que son sobrerreguladas tras la estimulación antigénica (por ejemplo, factor de la necrosis tumoral (TNF), interleucina (IL)-2, etc.).

[0035] Una modalidad de la invención proporciona un TCR que comprende dos polipéptidos (es decir, cadenas polipeptídicas), como una cadena alfa (α) de un TCR, una cadena beta (β) de un TCR, una cadena gamma (γ) de un TCR, una cadena delta (δ) de un TCR o una combinación de las mismas. Los polipéptidos del TCR de la invención pueden comprender cualquier secuencia de aminoácidos, siempre que el TCR tenga especificidad antigénica por RAS G12D. En algunas modalidades, el TCR no es natural.

[0036] En una modalidad de la invención, el TCR comprende dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende una región variable que comprende una región determinante de complementariedad (CDR)1, una CDR2 y una CDR3 de un TCR. En una modalidad de la invención, el TCR comprende una primera cadena polipeptídica que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (CDR1 de la cadena α de TCR 4373), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (CDR2 de la cadena α del TCR 4373) y un CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 (CDR3 de la cadena α del TCR 4373) y una segunda cadena polipeptídica que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (CDR1 de la cadena β del TCR 4373), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 (CDR2 de la cadena β del TCR 4373) y una CDR3 que comprende

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 (CDR3 de la cadena β del TCR 4373).

[0037] A este respecto, el TCR de la invención puede comprender cualquiera de una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. En una modalidad de la invención, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de: (a) todas de las SEQ ID NO: 1-3, (b) todas de las SEQ ID NO: 4-6 o (c) todas de las SEQ ID NO: 1-6. En una modalidad especialmente preferida, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de todas las SEQ ID NO: 1-6.

[0038] La CDR3 de la SEQ ID NO: 3 o 6, es decir, de la cadena α o la cadena β o ambas, puede comprender además una cisteína inmediatamente N-terminal al primer aminoácido de la CDR o una fenilalanina inmediatamente C-terminal al aminoácido final o ambas.

[0039] En una modalidad de la invención, el TCR comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de un TCR que comprende las CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el TCR puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos de: la SEQ ID NO: 7 (región variable de la cadena α del TCR 4373 con el péptido señal N-terminal natural); SEQ ID NO: 51 (región variable de la cadena α del TCR 4373 con el péptido señal N-terminal variante); SEQ ID NO: 8 (región variable de la cadena β del TCR 4373 con el

péptido señal N-terminal variante); SEQ ID NO: 52 (región variable de la cadena β del TCR 4373 con el péptido señal N-terminal natural); SEQ ID NO: 32 (región variable de la cadena α del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con IMGT); SEQ ID NO: 33 (región variable de la cadena β del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con IMGT); SEQ ID NO: 59 (región variable de la cadena α del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP); SEQ ID NO: 60 (región variable de la cadena β del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP); ambas de las SEQ ID NOs: 7 y 8; ambas de las SEQ ID NOs: 7 y 52; ambas de las SEQ ID NOs: 51 y 8; ambas de las SEQ ID NOs: 51 y 52; ambas de las SEQ ID NOs: 32 y 33 o ambas de las SEQ ID NOs: 59 y 60. Preferiblemente, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de (i) ambas de las SEQ ID NOs: 7 y 8, (ii) ambas de las SEQ ID NOs: 51 y 52 o (iii) ambas de las SEQ ID NOs: 32 y 33.

[0040] Los TCR de la invención pueden comprender además una región constante de la cadena α y una región constante de la cadena β . La región constante puede derivarse de cualquier especie adecuada como, por ejemplo, humano o ratón. En una modalidad de la invención, los TCR comprenden además regiones constantes de la cadena α y β murinas o regiones constantes de la cadena α y β humanas. Como se usa en la presente, el término "murina" o "humana", cuando se

refiere a un TCR o cualquier componente de un TCR descrito en la presente (por ejemplo, CDR, región variable, región constante, cadena α y/o cadena β), significa un TCR (o componente del mismo) el cual se deriva de un ratón o un humano, respectivamente, es decir, un TCR (o componente del mismo) que se origina de o era, en algún momento, expresado por una célula T de ratón o una célula T humana, respectivamente.

[0041] Una modalidad de la invención proporciona un TCR quimérico que comprende una región variable humana y una región constante murina, donde el TCR tiene especificidad antigénica por una secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico, presentada por una molécula HLA de la Clase I. La región constante murina puede proporcionar cualquiera de una o más ventajas. Por ejemplo, la región constante murina puede disminuir el apareamiento o emparejamiento incorrecto del TCR de la invención con TCR endógenos de la célula anfitriona en la cual se introduce el TCR de la invención. De manera alternativa o adicional, la región constante murina puede incrementar la expresión del TCR de la invención en comparación con el mismo TCR con una región constante humana. El TCR quimérico puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 (región constante de la cadena α murina WT), SEQ ID NO: 20 (región

constante de la cadena β murina WT) o ambas de las SEQ ID
NOs: 19 y 20. Preferiblemente, el TCR de la invención
comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de las SEQ
ID NOs: 19 y 20. El TCR quimérico puede comprender cualquiera
5 de las regiones constantes murinas descritas en la presente
en combinación con cualquiera de las regiones CDR como se
describe en la presente con respecto a otros aspectos de la
invención. A este respecto, el TCR, por ejemplo, puede
comprender las secuencias de aminoácidos de: (a) todas de las
10 SEQ ID NOs: 1-3 y 19; (b) todas de las SEQ ID NOs: 4-6 y 20;
o (c) todas de las SEQ ID NOs: 1-6 y 19-20. En otra modalidad
de la invención, el TCR quimérico puede comprender cualquiera
de las regiones constantes murinas descritas en la presente
en combinación con cualquiera de las regiones variables
15 descritas en la presente con respecto a otros aspectos de la
invención. A este respecto, el TCR, por ejemplo, puede
comprender las secuencias de aminoácidos de: (i) ambas de las
SEQ ID NOs: 7 y 19; (ii) ambas de las SEQ ID NOs: 51 y 19;
(iii) ambas de las SEQ ID NOs: 8 y 20; (iv) ambas de las SEQ
20 ID NOs: 52 y 20; (v) todas de las SEQ ID NOs: 7-8 y 19-20 o
(iv) todas de las SEQ ID NOs: 51-52 y 19-20.

[0042] En una modalidad de la invención, el TCR
comprende una cadena α que comprende una región variable y
una región constante y una cadena β que comprende una región
25 variable y una región constante. A este respecto, el TCR, por

ejemplo, puede comprender (a) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 (cadena α del TCR 4373 con un péptido señal N-terminal natural), donde: (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (b) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53 (cadena α del TCR 4373 con un péptido señal N-terminal variante), donde: (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (c) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 (cadena β del TCR 4373 con un péptido señal N-terminal variante), donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys; (d) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54 (cadena β del TCR 4373 con un péptido señal N-terminal natural), donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys; (e) ambas de (a) y (c), (a) y (d), (b) y (c) o (b) y (d); (f) una

cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34 (cadena α del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con IMGT), donde: (i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (g) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35 (cadena β del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con IMGT), donde X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys; (h) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61 (cadena α del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP), donde: (i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (i) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 (cadena β del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP), donde X en la posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys; o (j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i).

[0043] En otra modalidad de la invención, el TCR comprende las secuencias de aminoácido de: la SEQ ID NO: 23 (cadena α del TCR 4373 con la región constante murina WT y el péptido señal N-terminal WT), SEQ ID NO: 55 (cadena α del TCR 4373 con la región constante murina natural y el péptido señal N-terminal variante), SEQ ID NO: 24 (cadena β del TCR 4373 con la región constante murina natural y péptido señal N-terminal variante), SEQ ID NO: 56 (cadena β del TCR 4373 con la región constante murina WT y el péptido señal N-terminal natural), SEQ ID NO: 36 (cadena α del TCR 4373 con la región constante murina WT y sin péptido señal N-terminal predicho con IMGT), SEQ ID NO: 37 (cadena β del TCR 4373 con la región constante murina WT y sin péptido señal N-terminal predicho con IMGT), SEQ ID NO: 63 (cadena α del TCR 4373 con la región constante murina WT y sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP), SEQ ID NO: 64 (cadena β del TCR 4373 con la región constante murina WT y sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP), ambas de las SEQ ID NOs: 23 y 24, ambas de las SEQ ID NOs: 55 y 24, ambas de las SEQ ID NOs: 23 y 56, ambas de las SEQ ID NOs: 55 y 56, ambas de las SEQ ID NOs: 36 y 37 o ambas de las SEQ ID NOs: 63 y 64.

[0044] En una modalidad de la invención, el TCR comprende una región constante sustituida. A este respecto, el TCR, por ejemplo, puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los TCR descritos en la presente

con una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en la región constante de una o ambas de la cadena α y β . Preferiblemente, el TCR comprende una región constante murina con una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en la región constante murina de una o ambas de las cadenas α y β . En una modalidad especialmente preferida, el TCR comprende una región constante murina con una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en la región constante murina de la cadena α y una sustitución de aminoácido en la región constante murina de la cadena β . En algunas modalidades, los TCR que comprenden la región constante sustituida proporcionan de manera ventajosa uno o más del incremento del reconocimiento de objetivos de RAS⁺ G12D, incremento de la expresión por una célula anfitriona, disminución del emparejamiento erróneo con TCR endógenos e incremento de la actividad antitumoral en comparación con el TCR original que comprende una región constante no sustituida (natural). En general, las secuencias de aminoácidos sustituidas de las regiones constantes murinas de las cadenas α y β del TCR, SEQ ID NOs: 17 y 18, respectivamente, corresponden a todas o porciones de las secuencias de aminoácidos de la región constante murina no sustituidas SEQ ID NOs: 19 y 20, respectivamente, con la SEQ ID NO: 17 teniendo una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos cuando se compara con la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 18 que tiene una sustitución

de aminoácido cuando se compara con la SEQ ID NO: 20. A este respecto, una modalidad de la invención proporciona un TCR que comprende las secuencias de aminoácidos de (a) la SEQ ID NO: 17 (región constante de la cadena α), donde (i) X en la

5 posición 48 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 112 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 114 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 115 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (b) la SEQ ID NO: 18 (región constante de la

10 cadena β), donde X en la posición 57 es Ser o Cys; o (c) ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18. En una modalidad de la invención, el TCR que comprende la SEQ ID NO: 17 no comprende la SEQ ID NO: 19 (región constante murina no sustituida de la cadena α). En una modalidad de la invención, el TCR que

15 comprende la SEQ ID NO: 18 no comprende la SEQ ID NO: 20 (región constante murina no sustituida de la cadena β).

[0045] El primer aminoácido de cualquiera de las regiones constantes alfa de ratón descritas en la presente puede ser diferente de N de acuerdo a lo dispuesto en las SEQ

20 ID NOS: 17 y 19. Por ejemplo, en cualquier constructo de TCR, polipéptido, proteína, etc., como se describe en la presente, este primer aminoácido puede ser codificado por un codón partido (que tiene nucleótidos de ambas de una región variable y una región constante) de modo que cualquiera de

25 las regiones constantes alfa murinas pueda tener un

aminoácido diferente en esa posición. De manera similar, el primer aminoácido de cualquiera de las regiones constantes beta de ratón descritas en la presente puede ser diferente de E de acuerdo a lo dispuesto en las SEQ ID NOS: 18 y 20, por ejemplo, este primer aminoácido puede ser codificado por un codón partido.

[0046] En una modalidad de la invención, la región constante sustituida incluye sustituciones de cisteína en la región constante de una o ambas de las cadenas α y β para proporcionar un TCR sustituido con cisteína. Las cisteínas opuestas en las cadenas α y β proporcionan un enlace disulfuro que enlaza las regiones constantes de las cadenas α y β del TCR sustituido entre sí y que no está presente en un TCR que comprende las regiones constantes murinas sin sustituir. A este respecto, el TCR, por ejemplo, puede ser un TCR sustituido con cisteína en el cual una o ambas de las Thr nativas en la posición 48 (Thr48) de la SEQ ID NO: 19 y la Ser nativa en la posición 57 (Ser57) de la SEQ ID NO: 20 pueden ser sustituidas con Cys. Preferiblemente, ambas de la Thr48 nativa de la SEQ ID NO: 19 y la Ser57 nativa de la SEQ ID NO: 20 son sustituidas con Cys. Los Ejemplos de secuencias de regiones constantes de TCR sustituidas con cisteína se exponen en la Tabla 2. En una modalidad de la invención, el TCR sustituido con cisteína comprende (i) la SEQ ID NO: 17, (ii) la SEQ ID NO: 18 o (iii) ambas de las SEQ ID NOs: 17 y

18, donde ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18 son como se define en la Tabla 2. Los TCR sustituidos con cisteína de la invención pueden incluir la región constante sustituida además de cualquiera de las CDR o regiones variables descritas en la presente.

[0047] En una modalidad de la invención, el TCR quimérico, sustituido con cisteína comprende una cadena α de longitud completa y una cadena β de longitud completa. Los Ejemplos de secuencias de la cadena α y cadena β de TCR quimérico sustituido con cisteína se exponen en la Tabla 2. En una modalidad de la invención, el TCR comprende (i) la SEQ ID NO: 21, (ii) la SEQ ID NO: 53, (iii) la SEQ ID NO: 22, (iv) la SEQ ID NO: 54, (v) la SEQ ID NO: 34, (vi) la SEQ ID NO: 35, (vii) la SEQ ID NO: 61, (viii) la SEQ ID NO: 62, (ix) ambas de las SEQ ID NOs: 21 y 22, (x) ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 22, (xi) ambas de las SEQ ID NOs: 21 y 54, (xii) ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 54, (xiii) ambas de las SEQ ID NOs: 34 y 35 o (xiv) ambas de las SEQ ID NOs: 61 y 62, donde todas de las SEQ ID NOs: 21-22, 34-35, 53, 54, 61 y 62 son como se definen en la Tabla 2.

TABLA 2

SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
SEQ ID NO: 17 (cadena α de la región constante)	X en la posición 48 es Cys, X en la posición 112 es Ser, X en la posición 114 es Met y X en la posición 115 es Gly.

	SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
5	SEQ ID NO: 18 (cadena β de la región constante)	X en la posición 57 es Cys
	SEQ ID NO: 21 (cadena α del TCR 4373) (con el péptido señal N-terminal natural)	X en la posición 193 es Cys, X en la posición 257 es Ser, X en la posición 259 es Met y X en la posición 260 es Gly.
10	SEQ ID NO: 22 (cadena β del TCR 4373) (con el péptido señal N-terminal variante)	X en la posición 191 es Cys
15	SEQ ID NO: 34 (cadena α del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando IMGT sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 165 es Cys, X en la posición 229 es Ser, X en la posición 231 es Met y X en la posición 232 es Gly.
20	SEQ ID NO: 35 (cadena β del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando IMGT sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 172 es Cys
25	SEQ ID NO: 53 (cadena α del TCR 4373) (con el péptido señal N-terminal variante)	X en la posición 193 es Cys, X en la posición 257 es Ser, X en la posición 259 es Met y X en la posición 260 es Gly.

SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
SEQ ID NO: 54 (cadena β del TCR 4373) (con el péptido señal N-terminal natural)	X en la posición 191 es Cys
SEQ ID NO: 61 (cadena α del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando SignalP sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 172 es Cys, X en la posición 236 es Ser, X en la posición 238 es Met y X en la posición 239 es Gly.
SEQ ID NO: 62 (cadena β del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando SignalP sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 170 es Cys

15 [0048] En una modalidad de la invención, la
 secuencia de aminoácidos sustituida incluye sustituciones de
 uno, dos o tres aminoácidos en el dominio transmembranal (TM)
 de la región constante de la cadena α con un aminoácido
 hidrofóbico para proporcionar un TCR sustituido con
 20 aminoácido hidrofóbico (también denominado en la presente
 como "TCR modificado con LVL"). Las sustituciones de
 aminoácido hidrofóbico en el dominio TM del TCR pueden
 incrementar la hidrofobicidad del dominio TM del TCR en
 comparación con un TCR que carece de las sustituciones de
 25 aminoácido hidrofóbico en el dominio TM. A este respecto, el

TCR es un TCR modificado con LVL en el cual una, dos o tres de la Ser112, Met114 y Gly115 nativas de la SEQ ID NO: 19 pueden sustituirse independientemente con Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente con Leu, Ile o Val; y la Ser57 nativa de la SEQ ID NO: 20 puede sustituirse con Cys. Preferiblemente, las tres Ser112, Met114 y Gly115 nativas de la SEQ ID NO: 19 pueden sustituirse independientemente con Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente con Leu, Ile o Val. En una modalidad de la invención, el TCR modificado con LVL comprende (i) la SEQ ID NO: 17, (ii) la SEQ ID NO: 18 o (iii) ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18, donde ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18 son como se define en la Tabla 3. Los TCR modificados con LVL de la invención incluyen la región constante sustituida además de cualquiera de las CDR o regiones variables descritas en la presente.

[0049] En una modalidad de la invención, el TCR modificado con LVL comprende una cadena α de longitud completa y una cadena β de longitud completa. Los ejemplos de secuencias de la cadena α y cadena β de TCR modificado con LVL se exponen en la Tabla 3. En una modalidad de la invención, el TCR modificado con LVL comprende (i) la SEQ ID NO: 21, (ii) la SEQ ID NO: 53, (iii) la SEQ ID NO: 22, (iv) la SEQ ID NO: 54, (v) la SEQ ID NO: 34, (vi) la SEQ ID NO: 35, (vii) la SEQ ID NO: 61, (viii) la SEQ ID NO: 62, (ix) ambas de la SEQ ID NO: 21 y 22, (x) ambas de las SEQ ID NOs:

53 y 22, (xi) ambas de las SEQ ID NOs: 21 y 54, (xii) ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 54, (xiii) ambas de las SEQ ID NOs: 34 y 35 o (xiv) ambas de las SEQ ID NOs: 61 y 62, donde todas las SEQ ID NOs: 21-22, 34-35, 53, 54, 61 y 62 son como se defina en la Tabla 3.

TABLA 3

SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
SEQ ID NO: 17 (cadena α de la región constante)	X en la posición 48 es Thr; X en la posición 112 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 112 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 112 es Leu; X en la posición 114 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 114 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 114 es Ile; y X en la posición 115 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 115 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 115 es Val; Donde la SEQ ID NO: 17 no comprende la SEQ ID NO: 19 (región constante no sustituida de la cadena α)
SEQ ID NO: 18 (cadena β de la región constante)	X en la posición 57 es Ser
SEQ ID NO: 21 (cadena α del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal natural)	X en la posición 193 es Thr; X en la posición 257 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu; X en la posición 259 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 259 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 259 es Ile; y X en la posición 260 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

	SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
		preferiblemente donde X en la posición 260 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 260 es Val, Donde la SEQ ID NO: 21 no comprende la SEQ ID NO: 23 (cadena α del TCR 4373 no sustituida)
5	SEQ ID NO: 22 (cadena β del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal variante)	X en la posición 191 es Ser
10 15	SEQ ID NO: 34 (cadena α del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando IMGT sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 165 es Thr; X en la posición 229 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu; X en la posición 231 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 231 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 231 es Ile; y X en la posición 232 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 232 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 232 es Val, Donde la SEQ ID NO: 34 no comprende la SEQ ID NO: 36 (cadena α del TCR 4373 no sustituida)
20	SEQ ID NO: 35 (cadena β del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando IMGT sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 172 es Ser
25	SEQ ID NO: 53 (cadena α del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal)	X en la posición 193 es Thr; X en la posición 257 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu;

	SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
5	variante)	X en la posición 259 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 259 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 259 es Ile; y X en la posición 260 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 260 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 260 es Val, Donde la SEQ ID NO: 53 no comprende la SEQ ID NO: 55 (cadena α del TCR 4373 no sustituida)
10	SEQ ID NO: 54 (cadena β del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal natural)	X en la posición 191 es Ser
15	SEQ ID NO: 61 (cadena α del TCR 4373) (secuencia señal predicha utilizando SignalP sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 172 es Thr; X en la posición 236 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu; X en la posición 238 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 231 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 231 es Ile; y X en la posición 239 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 232 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 232 es Val, Donde la SEQ ID NO: 61 no comprende la SEQ ID NO: 63 (cadena α del TCR 4373 no sustituida)
20	SEQ ID NO: 62 (cadena β del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando SignalP sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 170 es Ser
25		

[0050] En una modalidad de la invención, la secuencia de aminoácidos sustituida incluye las sustituciones de cisteína en la región constante de una o ambas de las cadenas α y β en combinación con las sustituciones de uno, dos o tres aminoácidos en el dominio transmembranal (TM) de la región constante de la cadena α con un aminoácido hidrofóbico (también denominado aquí como "TCR modificado con LVL sustituido con cisteína"). A este respecto, el TCR es un TCR quimérico, modificado con LVL, sustituido con cisteína, en el cual la Thr48 nativa de la SEQ ID NO: 19 se sustituye con Cys; una, dos o tres de los Ser112, Met114 y Gly115 nativas de la SEQ ID NO: 19, se sustituyen independientemente con Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente Leu, Ile o Val; y la Ser57 nativa de la SEQ ID NO: 20 se sustituye con Cys. Preferiblemente, las tres Ser112, Met114 y Gly115 nativas de la SEQ ID NO: 19 pueden, sustituirse independientemente con Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente con Leu, Ile o Val. En una modalidad de la invención, el TCR modificado con LVL sustituido con cisteína comprende (i) la SEQ ID NO: 17, (ii) la SEQ ID NO: 18 o (iii) ambas de la SEQ ID NO: 17 y 18, en donde ambas de la SEQ ID NO: 17 y 18 son como se define en la Tabla 4. Los TCR modificados con LVL sustituidos con cisteína de la invención pueden incluir la región constante sustituida además de cualquiera de las CDR o regiones variables

descritas en la presente.

[0051] En una modalidad, el TCR modificado con LVL sustituido con cisteína comprende una cadena α de longitud completa y una cadena β de longitud completa. En una modalidad de la invención, el TCR modificado con LVL sustituido con cisteína comprende (i) la SEQ ID NO: 21, (ii) la SEQ ID NO: 53, (iii) la SEQ ID NO: 22, (iv) la SEQ ID NO: 54, (v) la SEQ ID NO: 34, (vi) la SEQ ID NO: 35, (vii) la SEQ ID NO: 61, (viii) la SEQ ID NO: 62, (ix) ambas de la SEQ ID NO: 21 y 22, (x) ambas las SEQ ID NOs: 53 y 22, (xi) ambos las SEQ ID NOs: 21 y 54, (xii) ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 54, (xiii) ambas de las SEQ ID NOs: 34 y 35 o (xiv) ambas de las SEQ ID NOs: 61 y 62, donde todas las SEQ ID NOs: 21-22, 34-35, 53, 54, 61 y 62 son como se define en la Tabla 4.

TABLA 4

SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
SEQ ID NO: 17 (cadena α de la región constante)	X en la posición 48 es Cys; X en la posición 112 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 112 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 112 es Leu; X en la posición 114 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 114 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 114 es Ile; y X en la posición 115 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 115 es Leu, Ile o Val; y especialmente preferiblemente donde X en la posición 115 es Val, Donde la SEQ ID NO: 17 no comprende simultáneamente todo de Ser en la posición 112, Met en la posición 114 y Gly en la posición 115.

	SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
	SEQ ID NO: 18 (cadena β de la región constante)	X en la posición 57 es Cys
5	SEQ ID NO: 21 (cadena α del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal natural)	X en la posición 193 es Cys; X en la posición 257 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu;
10		X en la posición 259 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 259 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 259 es Ile; y X en la posición 260 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 260 es Leu, Ile o Val; y especialmente preferiblemente donde X en la posición 260 es Val, Donde la SEQ ID NO: 21 no comprende simultáneamente todo de Ser en la posición 257, Met en la posición 259 y Gly en la posición 260.
15	SEQ ID NO: 22 cadena β del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal variante)	X en la posición 191 es Cys
20	SEQ ID NO: 34 (cadena α del TCR 4373) (secuencia predicha utilizó IMGT sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 165 es Cys; X en la posición 229 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu;
25		X en la posición 231 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 231 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 231 es Ile; y X en la posición 232 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 232 es Leu, Ile o Val; y especialmente preferiblemente donde X en la posición 232 es Val, Donde la SEQ ID NO: 34 no comprende simultáneamente todo de Ser en la posición 229, Met en la posición 231 y Gly en la posición 232.
	SEQ ID NO: 35 (cadena	X en la posición 172 es Cys

SEQ ID NO:	Definiciones de “X” en algunas modalidades
β del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando IMGT sin péptido señal N-terminal)	
SEQ ID NO: 53 (cadena α del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal variante)	X en la posición 193 es Cys; X en la posición 257 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 257 es Leu; X en la posición 259 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 259 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 259 es Ile; y X en la posición 260 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 260 es Leu, Ile o Val; y especialmente preferiblemente donde X en la posición 260 es Val, Donde la SEQ ID NO: 53 no comprende simultáneamente todo de Ser en la posición 257, Met en la posición 259 y Gly en la posición 260.
SEQ ID NO: 54 (cadena α del TCR 4373) (con péptido señal N-terminal natural)	X en la posición 191 es Cys
SEQ ID NO: 61 (cadena α del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando SignalP sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 172 es Cys; X en la posición 236 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 229 es Leu; X en la posición 238 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; preferiblemente donde X en la posición 231 es Leu, Ile o Val; especialmente preferiblemente donde X en la posición 231 es Ile; y X en la posición 239 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; preferiblemente donde X en la posición 232 es Leu, Ile o Val; y especialmente preferiblemente donde X en la posición 232 es Val, Donde la SEQ ID NO: 61 no comprende simultáneamente todas de Ser en la

SEQ ID NO:	Definiciones de "X" en algunas modalidades
	posición 229, Met en la posición 231 y Gly en la posición 232.
SEQ ID NO: 62 (cadena β del TCR 4373) (secuencia predicha utilizando SignalP sin péptido señal N-terminal)	X en la posición 170 es Cys

[0052] En una modalidad de la invención, el TCR modificado con LVL, sustituido con cisteína comprende (a) la SEQ ID NO: 38 (región constante de la cadena α del TCR modificado con LVL, sustituido con cisteína); (b) la SEQ ID NO: 39 (región constante de la cadena β del TCR modificado con LVL sustituido con cisteína); (c) la SEQ ID NO: 40 (cadena α del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína con secuencia señal N-terminal natural); (d) la SEQ ID NO: 41 (cadena β del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína con secuencia señal N-terminal variante); (e) la SEQ ID NO: 42 (cadena α del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína, sin secuencia señal N-terminal predicha por IMGT); (f) la SEQ ID NO: 43 (cadena β del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína, sin secuencia señal N-terminal predicha por IMGT); (g) la SEQ ID NO: 65 (cadena α del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína, sin secuencia señal N-terminal predicha por SignalP); (h) la SEQ ID NO: 66 (cadena β del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína, sin

secuencia señal N-terminal predicha por SignalP); (i) la SEQ ID NO: 57 (cadena α del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína, con secuencia señal N-terminal variante); (j) la SEQ ID NO: 58 (cadena β del TCR 4373 modificado con LVL sustituido con cisteína, con secuencia señal N-terminal natural); (k) ambas de (a) y (b); (l) ambas de (c) y (d); (m) ambas de (e) y (f); (n) ambas de (g) y (h); o (o) ambas de (i) y (j).

[0053] También la invención proporciona un polipéptido que comprende una porción funcional de cualquiera de los TCR descritos en la presente. El término "polipéptido", como se utiliza en la presente, incluye oligopéptidos y referencias a una sola cadena de aminoácidos conectada por uno o más enlaces peptídicos.

[0054] Con respecto a los polipéptidos de la invención, la porción funcional puede ser cualquier porción que comprenda aminoácidos contiguos del TCR del de los cuales es parte, siempre que la porción funcional se una específicamente a RAS G12D. El término "porción funcional", cuando se usa con referencia a un TCR, se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR de la invención, parte o fragmento que retiene la actividad biológica del TCR del cual es parte (el TCR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR que retienen la capacidad de unirse específicamente a RAS G12D (por ejemplo, dentro del

contexto de una molécula HLA-A*11:01) o detectan, tratan o previenen cánceres, en un grado similar, el mismo grado o en un mayor grado, que el TCR original. Con referencia al TCR original, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, 5 aproximadamente 10%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 50%, aproximadamente 68%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o más del TCR original.

[0055] La porción funcional puede comprender 10 aminoácidos adicionales en el amino o carboxi terminal de la porción o ambas porciones terminales, aminoácidos adicionales los cuales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR original. De manera adicional, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la 15 porción funcional, por ejemplo, específicamente la unión a RAS G12D; y/o que tienen la capacidad de detectar el cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. De manera más deseable, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR original.

20 [0056] El polipéptido puede comprender una porción funcional de cualquiera o ambas de las cadenas α y β de los TCR de la invención, como una porción funcional que comprende una o más de las CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de la cadena α y/o cadena β de un TCR de la invención. En una 25 modalidad de la invención, el polipéptido puede comprender la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (CDR1 de la cadena α), la SEQ ID NO: 2 (CDR2 de la cadena α), la SEQ ID NO: 3 (CDR3 de la cadena α), la SEQ ID NO: 4 (CDR1 de la cadena β), la SEQ ID NO: 5 (CDR2 de la cadena β), la SEQ ID NO: 6 (CDR3 de la cadena β) o una combinación de las mismas.

[0057] A este respecto, el polipéptido de la invención puede comprender cualquiera de una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de cualquiera de las la SEQ ID NO: 1-6. En una modalidad de la invención, el TCR comprende las secuencias de aminoácidos de: (a) todas de las la SEQ ID NO: 1-3, (b) todas de las la SEQ ID NO: 4-6 o (c) todas de las la SEQ ID NO: 1-6. En una modalidad preferida, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de todas las la SEQ ID NO: 1-6. La CDR3 de la SEQ ID NO: 3 o 6, es decir, la cadena α o la cadena β o ambas, pueden comprender además una cisteína inmediatamente N-terminal al primer aminoácido de la CDR o una fenilalanina inmediatamente C-terminal al aminoácido final o ambos.

[0058] En una modalidad de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR de la invención que comprende una combinación de las regiones CDR expuestas anteriormente. A este respecto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de (i) la SEQ ID NO: 7 (región variable de la cadena α con secuencia señal N-terminal natural), (ii) la SEQ

ID NO: 51 (región variable de la cadena α del TCR 4373 con la secuencia señal N-terminal variante); (iii) la SEQ ID NO: 8 (región variable de la cadena β con la secuencia señal N-terminal variante), (iv) la SEQ ID NO: 52 (región variable de la cadena β con secuencia señal N-terminal natural), (v) ambas de las SEQ ID NOs: 7 y 8; (vi) ambas de las SEQ ID NOs: 51 y 8, (vii) ambas de las SEQ ID NOs: 7 y 52 o (viii) ambas de las SEQ ID NOs: 51 y 52, (ix) la SEQ ID NO: 32 (región variable de la cadena α sin secuencia señal N-terminal predicha con IMGT), (x) la SEQ ID NO: 33 (región variable de la cadena β sin secuencia señal N-terminal predicha con IMGT), (xi) la SEQ ID NO: 59 (variable región de la cadena α del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP); (xii) la SEQ ID NO: 60 (región variable de la cadena β del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP); (xiii) ambas de las SEQ ID NOs: 32 y 33 o ambas de las SEQ ID NOs: 59 y 60. Preferiblemente, el polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos de (i) ambas las SEQ ID NOs: 7 y 8, (ii) ambas de las SEQ ID NOs: 51 y 52, (iii) ambas las SEQ ID NOs: 32 y 33 o (iv) ambas las SEQ ID NOs: 59 y 60.

[0059] En una modalidad de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender además la región constante del TCR de la invención expuesta anteriormente. A este respecto, el polipéptido puede comprender además la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 (región constante murina WT de la cadena α), la SEQ ID NO: 20 (región constante murina WT de la cadena β), SEQ ID NO: 17 (región constante murina sustituida de la cadena α), la SEQ ID NO: 18 (región constante murina sustituida de la cadena β), la SEQ ID NO: 38 (región constante de la cadena α del TCR modificado con LVL sustituido con cisteína); la SEQ ID NO: 39 (región constante de la cadena β del TCR modificado con LVL sustituido con cisteína); ambas de las SEQ ID NOs: 19 y 20, ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18 o ambas de las SEQ ID NOs: 38 y 39. Preferiblemente, el polipéptido comprende además las secuencias de aminoácidos de ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18, ambas de las SEQ ID NOs: 19 y 20 o ambas de las SEQ ID NOs: 38 y 39 en combinación con cualquiera de las regiones CDR o regiones variables descritas en la presente con respecto a otros aspectos de la invención. En una modalidad de la invención, una o ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18 del polipéptido son como se define en cualquiera de las Tablas 2-4. Las regiones constantes de la cadena α proporcionadas en la presente se muestran con una asparagina N-terminal. En algunas modalidades, el aminoácido N-terminal de las regiones constantes de la cadena α descritas en la presente es ácido aspártico.

[0060] En una modalidad de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender toda la longitud

completa de una cadena α o β del TCR descrito en la presente. A este respecto, el polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 53, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 54, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 56, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 61, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 62, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 63, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 64, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 57, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 58, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 65, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 66, ambas de las SEQ ID NOs: 21-22, ambas de las SEQ ID NOs: 21 y 54, ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 22, ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 54, ambas de las SEQ ID NOs: 23-24, ambas de las SEQ ID NOs: 55 y 24, ambas de las SEQ ID NOs: 23 y 54, ambas de las SEQ ID NOs: 55 y 54, ambas de las SEQ ID NOs: 34-35, ambas de las SEQ ID NOs: 36-37, ambas de las SEQ ID NOs: 40-41, ambas de las SEQ ID NOs: 57 y 41, ambas de las SEQ ID NOs: 40-58, ambas de las SEQ ID NOs: 57-58, ambas de las SEQ ID NOs: 42-43, ambas de las SEQ ID NOs: 61 y 62, ambas de las SEQ ID NOs: 63 y 64 o ambas de las SEQ ID NOs: 65 y 66. De manera alternativa, el polipéptido de la invención puede comprender ambas cadenas de los TCR descritos en la presente.

[0061] Por ejemplo, el polipéptido de la invención puede comprender (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde: (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21

es Thr o Cys; (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (b) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde: (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (c) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys; (d) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys; (e) ambas de (a) y (c), (a) y (d), (b) y (c) o (b) y (d); (f) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde: (i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (g) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o

Cys; (h) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde: (i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde X en la posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys; (j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i); (k) la SEQ ID NO: 40; (l) la SEQ ID NO: 57; (m) la SEQ ID NO: 41; (n) la SEQ ID NO: 58; (o) la SEQ ID NO: 42; (p) la SEQ ID NO: 43; (q) la SEQ ID NO: 65; (r) la SEQ ID NO: 66; (s) ambas de (k) y (m); (t) ambas de (l) y (m); (u) ambas de (k) y (n); (v) ambas de (l) y (n); (w) ambas de (o) y (p); o (x) ambas de (q) y (r). En una modalidad de la invención, cualquiera de una o más de las SEQ ID NOs: 21-22, 34-35, 53, 54, 61 y 62 del polipéptido son como se definen en cualquiera de las Tablas 2-4.

[0062] La invención proporciona además una proteína que comprende al menos uno de los polipéptidos descritos en la presente "proteína" significa una molécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas.

[0063] En una modalidad, la proteína de la invención puede comprender una primera cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID

NOs: 1-3 y una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4-6. La CDR3 de la SEQ ID NO: 3 o 6, es decir, de la cadena α o la cadena β o ambas, puede comprender además una cisteína inmediatamente N-terminal al primer aminoácido de la CDR o una fenilalanina inmediatamente C-terminal al aminoácido final o ambas.

[0064] En otra modalidad de la invención, (i) la primera cadena polipeptídica de la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; (ii) la primera cadena polipeptídica de la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8; (iii) la primera cadena polipeptídica de la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; (iv) la primera cadena polipeptídica de la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; (v) la primera cadena polipeptídica de la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 o (vi) la primera cadena polipeptídica de la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60.

[0065] La proteína de la invención puede comprender además cualquiera de las regiones constantes descritas en la presente con respecto a otros aspectos de la invención. A este respecto, en una modalidad de la invención, (i) la primera cadena polipeptídica puede comprender además la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender además la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; (ii) la primera cadena polipeptídica puede comprender además la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender además la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; o (ii) la primera cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 y una segunda cadena polipeptídica puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39. En una modalidad de la invención, una o ambas de las SEQ ID NOs: 17 y 18 de la proteína son como se definen en cualquiera de las Tablas 2-4.

[0066] De manera alternativa o adicional, la proteína de una modalidad de la invención puede comprender

(a) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde: (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (b) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde: (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (c) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys; (d) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys; (e) ambas de (a) y (c), (a) y (d), (b) y (c) o (b) y (d); (f) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde: (i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu,

Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (g) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys; (h) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde: (i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr o Cys; (ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y (iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp; (i) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62 (cadena β del TCR 4373 sin péptido señal N-terminal predicho con SignalP), donde X en la posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys o (j) ambas de (f) o ambas de (h) y (i) y; (k) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40; (k) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57; (m) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41; (n) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; (o) la primera cadena

polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; (p) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; (p) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65; (q) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66; (s) ambas de (k) y (m); (t) ambas de (l) y (m); (u) ambas de (k) y (n); (v) ambas de (m) y (n); (w) ambas de (o) y (p) o ambas de (q) y (r). En una modalidad de la invención, una o más de las SEQ ID NOs: 21-22, 34-35, 53, 54, 61 y 62 son como se definen en cualquiera de las Tablas 2-4.

[0067] La proteína de la invención puede ser un TCR. De manera alternativa, si, por ejemplo, la proteína comprende una sola cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de ambas de las SEQ ID NOs: 23 y 24, ambas de las SEQ ID NOs: 55 y 24, ambas de las SEQ ID NOs: 23 y 56, ambas de las SEQ ID NOs: 55 y 56, ambas de las SEQ ID NOs: 21 y 22, ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 22, ambas de las SEQ ID NOs: 21 y 54, ambas de las SEQ ID NOs: 53 y 54 o si la primera y/o segunda cadena polipeptídica de la proteína comprende además otras secuencias de aminoácidos, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que codifica para una inmunoglobulina o una porción de la misma, entonces la proteína de la invención puede ser una proteína de fusión. A este respecto, la invención también proporciona una proteína

de fusión que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente junto con al menos otro polipéptido. El otro polipéptido puede existir como un polipéptido separado de la proteína de fusión o puede existir como un polipéptido, el cual se expresa en trama (en tándem) con uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente. El otro polipéptido puede codificar para cualquier molécula peptídica o proteinácea o una porción de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a una inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula MHC, una molécula CD1, por ejemplo, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

[0068] La proteína de fusión puede comprender una o más copias del polipéptido de la invención y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más, copias del polipéptido de la invención y/o del otro polipéptido. Los métodos de preparación de proteínas de fusión adecuados se conocen en el estado de la técnica, e incluyen, por ejemplo, métodos recombinantes.

[0069] En algunas modalidades de la invención, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención pueden expresarse como una sola proteína que comprende un péptido enlazante que enlaza la cadena α y la cadena β . A este respecto, los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención puede comprender además un péptido enlazante. El péptido

enlazante puede facilitar de manera ventajosa la expresión de un TCR, polipéptido y/o proteína recombinante en una célula anfitriona. El péptido enlazante puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. El péptido enlazante puede ser un péptido enlazante escindible. Por ejemplo, el péptido enlazante puede ser un enlazante de a furina-SGSG-P2A que comprende la secuencia de aminoácidos de RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 25). Después de la expresión del constructo incluyendo el péptido enlazante por la célula anfitriona, el péptido enlazante puede ser escindido, dando como resultado cadena α y β separadas. En una modalidad de la invención, el TCR, polipéptido o proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende una cadena α de longitud completa, una cadena β de longitud completa y un péptido enlazante ubicado entre las cadenas α y β , por ejemplo, cadena α -enlazante-cadena β o cadena β -enlazante-cadena α .

[0070] En una modalidad de la invención, el TCR, polipéptido o proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 47 que comprende del N-terminal a C-terminal, una cadena β , un enlazante (SEQ ID NO:25) y una cadena α . La variante comprende una región variable de la cadena β (con un péptido señal variante) como se expone en la SEQ ID NO: 8 y a un dominio constante β modificado como se expone en la SEQ ID NO:39. La cadena β de

longitud completa de la variante se expone en la SEQ ID NO: 41. La variante también comprende una región variable de la cadena α (con un péptido señal natural) como se expone en la SEQ ID NO: 7 y un dominio α modificado como se expone en la
5 SEQ ID NO:38. La cadena α de longitud completa de la variante se expone en la SEQ ID NO: 40.

[0071] En otra modalidad de la invención, el TCR, polipéptido o proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 67 que comprende
10 del N-terminal a C-terminal, una cadena α , un enlazante (SEQ ID NO:25) y una cadena β . La variante comprende una región variable de la cadena α (con un péptido señal variante) como se expone en la SEQ ID NO: 51 y un dominio α modificado como se expone en la SEQ ID NO:38. La cadena α de longitud
15 completa de la variante se expone en la SEQ ID NO: 57. La variante también comprende una región variable de la cadena β (con un péptido señal natural) como se expone en la SEQ ID NO: 52 y un dominio constante β modificado como se expone en la SEQ ID NO:39. La cadena β de longitud completa de la
20 variante se expone en la SEQ ID NO: 58.

[0072] En algunas modalidades, el TCR, polipéptido o proteína descrita en la presente comprende una cadena α y/o una cadena β , como se describe en la presente, que comprende un péptido señal. En algunas modalidades, la secuencia del
25 péptido señal de cualquiera de las cadenas α y/o las cadenas

β descritas en la presente comprende un residuo de alanina o histidina sustituido por el residuo natural en la posición 2.

[0073] En algunas modalidades, el TCR, polipéptido o proteína descrita en la presente comprende una versión
5 madura de una cadena α y/o una cadena β , como se describe en la presente, que carece de un péptido señal. La secuencia del péptido señal o forma madura de la cadena α y/o una cadena β puede efectuarse de acuerdo con cualquier método conocido en el estado de la técnica incluyendo IMGT y SignalP.

10 [0074] La proteína de la invención puede ser un anticuerpo recombinante o una porción de unión de antígeno del mismo, que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente. Como se usa en la presente, "anticuerpo recombinante" se refiere a una proteína
15 recombinante (por ejemplo, diseñada genéticamente) que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención y una cadena polipeptídica de un anticuerpo o una porción de unión de antígeno del mismo. El polipéptido de un anticuerpo o porción de unión de unión de antígeno del mismo, puede ser
20 una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable o constante de una cadena pesada o ligera, un fragmento variable de una sola cadena (scFv) o un Fc, Fab o fragmento F(ab)₂' de un anticuerpo, etc. La cadena polipeptídica de un anticuerpo o una porción de unión de antígeno del mismo,
25 puede existir como un polipéptido separado del anticuerpo

recombinante. De manera alternativa, la cadena polipeptídica de un anticuerpo o una porción de unión de antígeno del mismo, puede existir como un polipéptido, el cual se expresa en trama (en tándem) con el polipéptido de la invención. El polipéptido de un anticuerpo o una porción de unión de antígeno del mismo, puede ser un polipéptido de cualquier anticuerpo o cualquier fragmento de anticuerpo, incluyendo cualquiera de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo descritos en la presente.

10 [0075] Incluidos en el alcance de la invención se encuentran variantes funcionales de los TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente. El término "variante funcional" como se usa en la presente, se refiere a un TCR, polipéptido o proteína que tiene identidad o similitud de
15 secuencia sustancial o significativa con un TCR, polipéptido o proteína original, variante funcional la cual retiene la actividad biológica del TCR, polipéptido o proteína de la cual es variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del TCR, polipéptido o proteína
20 descritas en la presente (el TCR, polipéptido o proteína original) que retiene la capacidad para unirse específicamente a RAS G12D para la cual el TCR original tiene especificidad antigénica o a la cual se une específicamente el polipéptido o proteína original, en un grado similar, el
25 mismo grado o hasta un grado mayor, como el TCR, polipéptido

o proteína original. Con referencia al TCR, polipéptido o proteína original, la variante funcional puede, por ejemplo, ser al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 50%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más idéntica en la secuencia de aminoácidos al TCR, polipéptido o proteína original, respectivamente.

[0076] La variante funcional puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original con al menos una sustitución conservadora de aminoácido. Las sustituciones conservadoras de aminoácido se conocen en el estado de la técnica e incluyen sustituciones de aminoácido en las cuales un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y/o químicas es intercambiado por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución conservadora de aminoácido puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido básico sustituido por otro aminoácido básico (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido con una

cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.

[0077] De manera alternativa o adicional, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del TCR, polipéptido o proteína original con al menos una sustitución no conservadora de aminoácido. En este caso, es preferible que la sustitución no conservadora de aminoácido no interfiera con o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. Preferiblemente, la sustitución no conservadora de aminoácido potencia la actividad biológica de la variante funcional de modo que la actividad biológica de la variante funcional se incremente en comparación con el TCR, polipéptido o proteína original.

[0078] Cada péptido señal de los TCR, polipéptidos, proteínas, variantes funcionales y porciones funcionales descritas en la presente, cuando están presentes, puede ser cualquier péptido señal de TCR adecuado, siempre y cuando el TCR, polipéptido, proteína o variante funcional se exprese y tenga especificidad antigénica por a una secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico presentado por una molécula HLA de la Clase I.

[0079] El TCR, polipéptido o proteína puede consistir esencialmente de la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en la presente, de modo

que los otros componentes del TCR, polipéptido o proteína, por ejemplo otros aminoácidos, no cambian materialmente la actividad biológica del TCR, polipéptido o proteína. A este respecto, el TCR, polipéptido o proteína de la invención

5 puede, por ejemplo, consistir esencialmente de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 53, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 54, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 55, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 56, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 61, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 62, la SEQ ID

10 NO: 36, la SEQ ID NO: 63, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 64, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 57, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 58, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 65, la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 66, ambas de las SEQ ID NOS: 21-22, ambas de las SEQ ID NOS: 53 y 22, ambas de las SEQ ID NOS: 21 y 54,

15 ambas de las SEQ ID NOS: 53 y 54, ambas de las SEQ ID NOS: 23-24, ambas de las SEQ ID NOS: 55 y 24, ambas de las SEQ ID NOS: 23 y 54, ambas de las SEQ ID NOS: 55 y 56, ambas de las SEQ ID NOS: 34-35, ambas de las SEQ ID NOS: 61-62, ambas de las SEQ ID NOS: 36-37, ambas de las SEQ ID NOS: 63-64, ambas

20 de las SEQ ID NOS: 40-41, ambas de las SEQ ID NOS: 57 y 41, ambas de las SEQ ID NOS: 40 y 58, ambas de las SEQ ID NOS: 57 y 58, ambas de las SEQ ID NOS: 42-43 o ambas de las SEQ ID NOS: 65-66. También, por ejemplo, Los TCR, polipéptidos o proteínas de la invención pueden consistir esencialmente de

25 las secuencias de aminoácidos de(i) la SEQ ID NO: 7, (ii) la

SEQ ID NO: 51, (iii) la SEQ ID NO: 8, (iv) la SEQ ID NO: 52, (v) la SEQ ID NO: 32, (vi) la SEQ ID NO: 33 (vii) la SEQ ID NO: 59 o (viii) la SEQ ID NO: 60. Además, Los TCR, polipéptidos o proteínas de la invención pueden consistir
5 esencialmente de las secuencias de aminoácidos de (a) cualquiera de una o más de las SEQ ID NOs: 1-6; (b) todas de las SEQ ID NO: 1-3; (c) todas de las SEQ ID NO: 4-6; o (d) todas de las SEQ ID NOs: 1-6.

[0080] Los TCR, polipéptidos y proteínas de la
10 invención puede ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los TCR, polipéptidos o proteínas retengan su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad para unirse específicamente a RAS G12D; detectar el cáncer en un
15 mamífero; o tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, etc. Por ejemplo, el polipéptido puede estar en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos de longitud, como aproximadamente 50, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125,
20 aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000 o más aminoácidos de longitud. A este
25 respecto, el polipéptido de la invención también incluye

oligopéptidos.

[0081] Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención puede comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Esos aminoácidos sintéticos se conocen en el estado de la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano carboxílico, norleucina, ácido α -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometilcisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano carboxílico, ácido α -aminociclohexano carboxílico, ácido α -aminocicloheptano carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α,β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -ter-butilglicina.

[0082] Los TCR, polipéptidos y proteínas de la invención puede ser, por ejemplo, glicosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclados a través de, por ejemplo, un puente disulfuro o convertidos en una sal de adición de ácido y/o dimerizados o

polimerizados o conjugados opcionalmente.

[0083] El TCR, polipéptido y/o proteína de la invención puede obtenerse por métodos conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, síntesis *de novo*. También, los polipéptidos y proteínas pueden producirse de manera recombinante utilizando los ácidos nucleicos descritos en la presente utilizando métodos recombinantes estándar. Véase, por ejemplo, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012). De manera alternativa, los TCR, polipéptidos y/o proteínas descritos en la presente pueden ser sintetizados comercialmente por cualquiera de una variedad de entidades comerciales. A este respecto, los TCR de la invención, polipéptidos y proteínas puede ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados. Una modalidad de la invención proporciona un TCR, polipéptido o proteína aislado o purificado codificado por cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores descritos en la presente con respecto a otros aspectos de la invención. Otra modalidad de la invención proporciona un TCR, polipéptido o proteína aislado o purificado que resulta de la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores descritos en la presente con respecto a otros aspectos de la invención una célula. Otra modalidad más de la invención proporciona un método de producción de cualquiera de los TCR, polipéptidos o

proteínas descritos en la presente, el método comprende cultivar cualquiera de las células anfitrionas o poblaciones de células anfitrionas descritas en la presente de modo que se produce el TCR, polipéptido o proteína.

5 [0084] Incluidos en el alcance de la invención se encuentran conjugados, por ejemplo, bioconjugados, que comprende cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas de la invención (incluyendo cualquiera de las porciones funcionales o variantes de las mismas), ácidos nucleicos,
10 vector de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células anfitrionas o anticuerpos o porciones de unión de antígeno de los mismos. Conjugados, así como métodos de síntesis de conjugados en general, conocidos en el estado de la técnica.

15 [0085] Una modalidad de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente. Un "Ácido nucleico" como se usa en la presente, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y
20 "molécula de ácido nucleico" y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, el cual puede ser de una sola cadena o doble cadena, el cual puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados y que puede contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, como un
25 enlace de fosforoamidato o un enlace de fosforotioato, en

lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En una modalidad, el ácido nucleico comprende ADN complementario (ADNc). Generalmente se prefiere que el ácido nucleico no comprenda ninguna inserción, supresión, inversión y/o sustitución. Sin embargo, en algunos casos puede ser adecuado, como se discute en la presente, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, supresiones, inversiones y/o sustituciones.

[0086] Preferiblemente, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. Como se usa en la presente, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivientes uniendo segmentos de ácido nucleico natural o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva o (ii) moléculas que resultan de la replicación de aquellas descritas en (i) anteriormente. Para los propósitos de la presente, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

[0087] En una modalidad de la invención, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de (i) la SEQ ID NO: 44 (secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena α del TCR 4373), (ii) la SEQ ID NO: 45 secuencia de nucleótidos que codifica para la región variable de la cadena β del TCR 4373 o (iii) ambas de las SEQ ID NOs: 44-45.

[0088] Los ácidos nucleicos pueden construirse a base de síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook et al., supra. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos naturales o varios nucleótidos modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado después de la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-adetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, β -D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida en N⁶, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, β -D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo,

queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil éster de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. De manera alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención puede ser comprarse de cualquiera de una variedad de entidades comerciales.

[0089] El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente. En una modalidad de la invención, el ácido nucleico comprende una secuencia optimizada por codón de los nucleótidos que codifican para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritos en la presente. Sin atarse a ninguna teoría particular o mecanismo particular, se cree que la optimización por codón de la secuencia de nucleótidos incrementa la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización por codón de la secuencia de nucleótidos puede implicar sustituir un codón nativo por otro codón que codifique para el mismo aminoácido, pero puede ser traducido por ARNt que está más fácilmente disponible dentro de la célula, incrementando de este modo la eficiencia de la traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras secundarias de ARNm que interferirían con la traducción, incrementando de este modo la eficiencia de la traducción.

[0090] La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos la cual es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente o una
5 secuencia de nucleótidos la cual se hibrida bajo condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente.

[0091] La secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones rigurosas, se hibrida preferiblemente bajo
10 condiciones altamente rigurosas. "Condiciones altamente rigurosas" significa que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente a una secuencia objetivo (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los nucleótidos descritos en la presente) en una cantidad detectablemente más
15 fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de altamente rigurosas incluyen condiciones las cuales se distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta o una que solo contiene unas cuantas discrepancias dispersas de una secuencia aleatoria que se
20 esperaba que tuviera unas cuantas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que discreparan de la secuencia de nucleótido. Esas regiones pequeñas de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases y la hibridación altamente rigurosa las
25 hace más fácilmente distinguibles. Las condiciones de

rigurosidad relativamente alta incluirían, por ejemplo, condiciones de bajo salado y/o alta temperatura, como las proporcionadas por NaCl aproximadamente 0.02-0.1 M o equivalentes, a temperaturas de aproximadamente 50-70°C. Esas
5 condiciones altamente rigurosas toleran pocas, si las hay, discrepancias entre la secuencia de nucleótidos y la plantilla o cadena objetivo y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los TCR de la invención. Se apreciará de manera general que las condiciones
10 pueden volverse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

[0092] Una modalidad de la invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 70% o más, por
15 ejemplo, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% idéntica a cualquiera de los ácidos
20 nucleicos descritos en la presente. A este respecto, el ácido nucleico puede consistir esencialmente de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente.

[0093] Una modalidad de la invención proporciona un ácido nucleico aislado y purificado que comprende, de 5' a
25 3', una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda

secuencia de nucleótidos, donde la primera y segunda
secuencia de nucleótidos, respectivamente, codifican para las
secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 7 y 8; 51 y 8; 7
y 52; 51 y 52; 8 y 7; 8 y 51; 52 y 7; 52 y 51; 21 y 22; 21 y
5 54; 53 y 22; 53 y 54; 22 y 21; 54 y 21; 22 y 53; 54 y 53; 23
y 24; 55 y 24; 23 y 56; 55 y 56; 24 y 23; 24 y 55; 56 y 55;
56 y 23; 32 y 33; 33 y 32; 59 y 60; 60 y 59; 34 y 35; 35 y
34; 61 y 62; 62 y 61; 36 y 37; 37 y 36; 63 y 64; 64 y 63; 40
y 41; 57 y 41; 40 y 58; 57 y 58; 41 y 40; 41 y 57; 58 y 40;
10 58 y 57; 42 y 43; 43 y 42; 65 y 66; o 66 y 65.

[0094] En una modalidad de la invención, el aislado
o purificado de ácido nucleico comprende además una tercera
secuencia de nucleótidos interpuesta entre la primera y
segunda secuencia de nucleótidos, donde la tercera secuencia
15 de nucleótidos codifica para un péptido enlazante
escindible. En una modalidad de la invención, el péptido
enlazante escindible comprende la secuencia de aminoácidos de
la RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 25).

[0095] Los ácidos nucleicos de la invención pueden
20 incorporarse en un vector de expresión recombinante. A este
respecto, la invención proporciona a vector de expresión
recombinante que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos
de la invención. En una modalidad de la invención, el vector
de expresión recombinante comprende una secuencia de
25 nucleótidos que codifica para la cadena α , la cadena β y

péptido enlazante.

[0096] Para propósitos de la presente, el término "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótido o polinucleótido modificado genéticamente que
5 permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por la célula anfitriona, cuando el constructo comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica para el ARNm , proteína, polipéptido o péptido, el vector se pone en contacto con la célula bajo condiciones suficientes para
10 tener el ARNm, proteína, polipéptido y péptido expresado dentro de la célula. Los vectores de la invención no son naturales del todo. Sin embargo, partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender cualquier
15 tipo de nucleótido, incluyendo, pero sin limitarse a ADN y ARN, los cuales pueden ser de una sola cadena o doble cadena, sintetizado u obtenidos en parte de fuentes naturales y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden
20 comprender enlaces internucleotídicos naturales, no naturales o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los nucleótidos o enlaces nucleotídicos no naturales o alterados no impiden la transcripción o replicación del vector.

[0097] El vector de expresión recombinante de la
25 invención puede ser cualquier vector de expresión

recombinante adecuado y puede utilizarse para transformar o transfectar cualquier célula anfitriona adecuada. Algunos vectores incluyen aquellos diseñados para la propagación o expansión o para la expresión o ambas, como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse de la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También pueden utilizarse vectores bacteriófagos, como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión vegetales incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión animales incluyen pEUK-C1, pMAM y pMAMneo (Clontech). Preferiblemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral. En una modalidad especialmente preferida, el vector de expresión recombinante es un vector MSGV1. En otra modalidad de la invención, el vector de expresión recombinante es un transposón o un vector lentiviral.

[0098] El vector de expresión recombinante de la invención puede prepararse utilizando técnicas de ADN recombinantes estándar descritas en, por ejemplo, Green y Sambrook et al., supra. Los constructos de vectores de expresión, los cuales son circulares o lineales, pueden

prepararse para que contengan un sistema de replicación funcional en una célula anfitriona procariota o eucariota. Los sistemas de replicación se pueden derivarse, por ejemplo, de plásmido ColE1 2 μ , λ , SV40, papiloma virus bovino y
5 similares.

[0099] De manera deseable, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, como codones de inicio y terminación de la transcripción y traducción, las cuales son específicas para el tipo de célula anfitriona (por
10 ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en la cual será introducido el vector, según sea apropiado y tomando en consideración si el vector es a base de ADN o ARN.

[0100] El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, lo cual permite la
15 selección de células anfitrionas transformadas o transfectadas. Los genes marcadores pueden incluir resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en una célula anfitriona auxotrófica para proporcionar prototrofia y
20 similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a la neomicina/G418, genes de resistencia a la higromicina, genes de resistencia al histidinol, genes de resistencia a la tetraciclina y genes de resistencia a la
25 ampicilina.

[0101] El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR, polipéptido o proteína o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a o que se hibrida a la secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR, polipéptido o proteína. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos del tejido y específicos de la etapa de desarrollo, está dentro de la destreza del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de las destrezas del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV y un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

[0102] Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden diseñarse para la expresión transitoria, para la expresión estable o para ambas. También, los vectores de expresión recombinante pueden producirse para la expresión constitutiva o para la expresión inducible.

[0103] Además, los vectores de expresión recombinante pueden producirse para incluir un gen suicida. Como se usa en la presente, el término "gen suicida" se refiere a un gen que puede hacer que la célula que exprese el

gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiera sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, en la célula en la cual se expresa el gen y haga que la célula muera cuando la célula entre en contacto o se expone al agente. Los genes suicidas son conocidos en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, el gen de timidina cinasa (TK) del Virus del Herpes Simple (HSV), sistema de genes de citosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa, nitroreductasa y caspasa 9 inducible.

[0104] Otra modalidad de la invención proporciona además una célula anfitriona que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos en la presente. Como se usa en la presente, el término "célula anfitriona" se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula anfitriona puede ser una célula eucariótica, por ejemplo, célula de planta, animal, hongo o alga o puede ser una célula procariótica, por ejemplo, bacteria o protozoario. La célula anfitriona puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un humano o ratón. La célula anfitriona puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células anfitrionas adecuadas son conocidas en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, células *E. coli* DH5 α , células de

ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Para el propósito de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula anfitriona es preferiblemente una célula procariótica, por ejemplo, una célula DH5 α . Para los propósitos de producir un TCR, polipéptido o proteína recombinante, la célula anfitriona es preferentemente una célula de mamífero. Más preferiblemente la célula anfitriona es una célula humana. Aunque la célula anfitriona puede ser cualquier tipo de célula, puede originarse de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier etapa del desarrollo, la célula anfitriona preferentemente es un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). De manera más preferible, la célula anfitriona es una célula T. En una modalidad de la invención, la célula anfitriona es un linfocito humano. En otra modalidad de la invención, la célula anfitriona se selecciona de una célula T, una célula T asesina natural (NKT), una célula T asesina natural invariante (iNKT) y una célula asesina natural (NK). Otra modalidad más de la invención proporciona un método de producción de una célula anfitriona que expresa un TCR que tiene especificidad antigénica por el péptido de la VVVGADDGVGK (SEQ ID NO: 29), el método comprende poner en contacto una célula con cualquiera de los vectores descritos en la presente bajo condiciones que permitan la introducción

del vector en la célula.

[0105] Para los propósitos de la misma, la célula T puede ser cualquier célula T, como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria o una célula T de una línea de células T cultivadas, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc. o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T puede obtenerse de numerosas fuentes, incluyendo pero sin limitarse a, sangre, médula ósea, nodo linfático, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden ser enriquecidas o purificadas. Preferiblemente, la célula T es una célula T humana. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T que pueda estar en cualquier etapa del desarrollo, incluyendo pero sin limitarse a células doblemente positivas T CD4⁺/CD8⁺, células T colaboradora CD4⁺, por ejemplo, células Th1 y Th2, células T CD4⁺, Células T CD8⁺ (por ejemplo, células T citotóxicas), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central y células T de memoria efectoras), células T sin exponer y similares.

[0106] También se proporciona en la invención una población de células que comprende al menos una célula anfitriona descrita en la presente. La población de células puede ser una población heterogénea que comprenda células anfitrionas que comprenden cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos, además de al menos otra

célula, por ejemplo, una célula anfitriona (por ejemplo, una célula T), que no comprenda ninguno de los vectores de expresión recombinante u otra célula diferente a una célula T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula de músculo, una célula del cerebro, etc. De manera alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la cual la población comprenda principalmente células anfitrionas (por ejemplo, consista esencialmente de) comprenda el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la cual todas las células de la población sean clones de una sola célula anfitriona que comprenda el vector de expresión recombinante, de modo que todas las células de la población comprendan el vector de expresión recombinante. En una modalidad de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células anfitrionas que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en la presente.

[0107] En una modalidad de la invención, el número de células en la población puede expandirse rápidamente. La expansión del número de células T puede lograrse por cualquiera de un número de métodos conocidos en el estado de la técnica como se describe en, por ejemplo, la Patente Estadounidense 8,034,334; Patente Estadounidense 8,383,099;

Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 2012/0244133; Dudley et al., *J. Immunother.*, 26:332-42 (2003); y Riddell et al., *J. Immunol. Methods*, 128:189-201 (1990). En una modalidad, la expansión del número de células T se lleva a cabo cultivando las células T con anticuerpo OKT3, IL-2 y PBMC de alimentación (por ejemplo, PBMC alogénicas irradiadas).

[0108] Los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas (incluyendo las poblaciones de las mismas) de la invención, pueden aislarse y/o purificarse. El término "aislada", como se usa en la presente, significa que ha sido removida de su ambiente natural. El término "purificada", como se usa en la presente, significa que se ha incrementado su pureza, donde la "pureza" es un término relativo y no necesariamente debe interpretarse como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser al menos aproximadamente 50%, puede ser mayor que aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o puede ser aproximadamente 100%.

[0109] Los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante y células anfitrionas (incluyendo las poblaciones de las mismas) de la invención, todas las cuales se refieren colectivamente aquí como "materiales de TCR de la invención" aquí posteriormente,

pueden formularse en una composición, como una composición farmacéutica. A este respecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión y células anfitrionas (incluyendo las poblaciones de las mismas), descritas en la presente y un portador 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. De manera alternativa, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR de la invención en combinación con otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos como un agente quimioterapéutico, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

[0110] Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de aquellos usados convencionalmente para el material de TCR de la invención particular bajo consideración. Los métodos para preparar composiciones administrables son conocidos o evidentes a aquellos expertos en el estado de la técnica y se

describen con mayor detalle en, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Ed., Pharmaceutical Press (2012). Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno el cual no tenga efectos laterales dañinos o toxicidad bajo las condiciones de uso.

[0111] La elección del portador será determinada en parte por el material de TCR de la invención particular, así como por el método particular utilizado para administrar el material de TCR de la invención. En consecuencia, existe una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las formulaciones adecuadas pueden incluir cualquiera de aquellas para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intratumoral o interperitoneal. Puede utilizarse más de una ruta para administrar los materiales de TCR de la invención y, en ciertos casos, una ruta particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más efectiva que otra ruta.

[0112] Preferiblemente, el material de TCR de la invención se administra por inyección, por ejemplo, intravenosamente. Cuando el material de TCR de la invención es una célula anfitriona (o población de la misma) que expresa el TCR nativo, el portador farmacéuticamente aceptable para las células para inyección puede incluir cualquier portador isotónico como, 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), 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 modalidad, el portador farmacéuticamente aceptable se suplementa con albúmina de suero humano.

[0113] Para los propósitos de la invención, la cantidad o dosis (por ejemplo, el número de células cuando el material de TCR de la invención es una o más células) del material de TCR de la invención administrada deberá ser suficiente para el efecto, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un marco de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de TCR de la invención deberá ser suficiente para unirse a un antígeno del cáncer (por ejemplo, RAS G12D) o detectar, tratar o prevenir el cáncer en un período de aproximadamente 2 horas o más, por ejemplo, de 12 a 24 o más horas, desde el momento de la administración. En ciertas modalidades, el periodo de tiempo deberá ser aún mayor. La dosis será determinada por la eficacia del material de TCR de la invención particular y la condición del animal (por ejemplo, humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, humano) que será tratado.

[0114] Muchos ensayos para determinar la dosis administrada son bien conocidos en el estado de la técnica. Para los propósitos de la invención, un ensayo, el cual comprende comparar el grado en el cual las células objetivo son lisadas o IFN- γ es secretado por células T que expresan el TCR, polipéptido o proteína de la invención después de la administración de una dosis dada de esas células T a un mamífero entre un conjunto de mamíferos a cada uno de los cuales se proporciona una dosis diferente de las células T, podría utilizarse para determinar una dosis inicial para ser administrada un mamífero. El grado en el cual las células objetivo son lisadas o el IFN- γ es secretado después de la administración de una cierta dosis puede ensayarse por métodos conocidos en el estado de la técnica.

[0115] La dosis del material de TCR de la invención también será determinada por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto lateral adverso que pueda acompañar la administración del material de TCR de la invención particular. Típicamente, el médico tratante decidirá la dosis del material de TCR de la invención con la cual tratará a cada paciente individual, tomando en consideración una variedad de factores, como la edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, material de TCR de la invención a administrarse, la ruta de administración y la severidad del cáncer que esté siendo tratado. En una modalidad, en la cual

el material de TCR de la invención es una población de células, el número de células administradas por infusión puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{12} células o más. En ciertas modalidades
5 pueden administrarse menos de 1×10^6 células.

[0116] Un experto en el estado de la técnica apreciará fácilmente que los materiales de TCR de la invención de la invención pueden ser modificados en cualquiera de un número de formas, de modo que la eficacia
10 terapéutica o profiláctica del material de TCR de la invención se incremente a través de la modificación. Por ejemplo, los materiales de TCR de la invención pueden conjugarse ya sea directa o indirectamente a través de un puente a un agente quimioterapéutico. La práctica de
15 conjugación de compuestos en un agente quimioterapéutico es conocida en el estado de la técnica. Un experto en el estado de la técnica reconoce que los sitios sobre los materiales de TCR de la invención, que no son necesarios para la función de los materiales de TCR de la invención, son sitios adecuados
20 para la unión por un puente y/o un agente quimioterapéutico, siempre que el puente y/o agente quimioterapéutico, una vez unido a los materiales de TCR de la invención, no interfiera con la función de los materiales de TCR de la invención, es decir, la capacidad para unirse a RAS G12D o para detectar,
25 tratar o prevenir el cáncer.

[0117] Se contempla que las composiciones farmacéuticas, TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas y poblaciones de células de la invención puedan utilizarse en métodos de tratamiento o prevención del cáncer. Sin atarse a una teoría en particular, se cree que los TCR de la invención se unen específicamente a RAS G12D, de modo que el TCR (o polipéptido o proteína de la invención relacionadas), cuando sea expresado por una célula, sea capaz de mediar una respuesta inmune contra una célula objetivo que exprese RAS G12D. A este respecto, una modalidad de la invención proporciona un método de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero cualquiera de las composiciones farmacéuticas, TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique para cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas descritas en la presente o cualquier célula anfitriona o población de células que comprenda un vector recombinante que codifique para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente, en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero.

[0118] Una modalidad de la invención proporciona un método de inducción de una respuesta inmune contra un cáncer

en un mamífero, que comprende administrar al mamífero cualquiera de las composiciones farmacéuticas, TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que
5 comprenda una secuencia nucleotídica que codifique para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente o cualquier célula anfitriona o población de células que comprende un vector recombinante que codifique para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas
10 descritos en la presente, en una cantidad efectiva para inducir una respuesta inmune contra el cáncer en un mamífero.

[0119] Una modalidad de la invención proporciona cualquiera de las composiciones farmacéuticas, TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente, cualquier
15 ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas descritas en la presente o cualquier célula anfitriona o población de células que comprende un vector recombinante que codifica
20 para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente, para utilizarse en el tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero.

[0120] Una modalidad de la invención proporciona cualquiera de las composiciones farmacéuticas, TCR,
25 polipéptidos o proteínas descritas en la presente, cualquier

ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente o cualquier célula anfitriona o población de células que comprende un vector recombinante el cual codifica para cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas descritas en la presente, para utilizarse en la inducción de una respuesta inmune contra el cáncer en un mamífero.

[0121] Los términos "tratar" y "prevenir", así como palabras derivadas de las mismas, como se usan en la presente, no necesariamente implican 100% del tratamiento prevención completa. En su lugar existen varios grados de tratamiento o prevención de los cuales un experto en el estado de la técnica reconoce que tienen un beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o prevención proporcionado por el método de la invención puede incluir el tratamiento o prevención de una o más condiciones o síntomas del cáncer que este siendo tratado o prevenido. Por ejemplo, el tratamiento o prevención puede incluir promover la regresión de un tumor. También, para los propósitos de la presente, "prevención" puede abarcar retrasar la aparición del cáncer o un síntoma o condición del mismo. De manera alternativa o adicional, la

"prevención" puede abarcar la prevención o retardo de la recurrencia del cáncer o un síntoma o condición del mismo.

[0122] También en la presente se proporciona un método para detectar la presencia del cáncer en un mamífero.

5 El método comprende (i) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con cualquiera de los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células anfitrionas, poblaciones de células o composición farmacéuticas de la invención
10 descritas en la presente, formando por lo tanto un complejo, (ii) detectando el complejo, donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

[0123] Con respecto al método de detección del cáncer de la invención en un mamífero, la muestra de células
15 puede ser una muestra que comprenda células complejas, lisados de las mismas o una fracción de los lisados celulares complejos, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción de proteína entera o una fracción de ácido nucleico.

20 [0124] Para los propósitos del método de detección de cáncer de la invención, el contacto puede tomar lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferiblemente, el contacto es *in vitro*.

[0125] También, la detección del complejo puede
25 ocurrir a través de cualquier número de formas conocidas en

el estado de la técnica. Por ejemplo, los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas o poblaciones de células de la invención descritas en la presente, pueden etiquetarse o marcarse con una etiqueta o marca detectable como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, tiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano) y partículas elementales (por ejemplo, partículas de oro).

[0126] Para los propósitos de los métodos de la invención, donde se administran células anfitrionas o poblaciones de células, las células pueden ser células que sean alogénicas o autólogas al mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas al mamífero.

[0127] Con respecto a los métodos de la invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo, por ejemplo, cualquier cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer del ano, cáncer del canal anal o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de articulaciones, cáncer de cuello, cáncer de vejiga o pleura, cáncer de la nariz, de la cavidad nasal o el oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vagina, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica,

cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer cervical uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de la hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, hígado cáncer, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer nasofaríngeo, linfoma no Hodgkin, cáncer de la orofaringe, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer pancreático, cáncer del peritoneo, omento y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer del intestino delgado, cáncer de tejido blando, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer tiroideo, cáncer de útero, cáncer de uréter y cáncer de la vejiga urinaria. Un cáncer preferido es el cáncer pancreático, colorrectal, de pulmón, endometrial, de ovario o próstata. Preferiblemente, el cáncer de pulmonar es adenocarcinoma pulmonar, el cáncer de ovario es cáncer de ovario epitelial y el cáncer pancreático es adenocarcinoma pancreático. En una modalidad de la invención, el cáncer expresa una secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico, donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una secuencia de aminoácidos de KRAS humana mutada, HRAS humana mutada o NRAS humana mutada y donde la posición 12 se define con referencia a la proteína KRAS humana WT, HRAS humana WT o

NRAS humana WT, respectivamente. La KRAS humana mutada, HRAS humana mutada y NRAS humana mutada expresada por el cáncer pueden ser como se describe con respecto a otros aspectos de la invención.

5 [0128] El mamífero al que se hace referencia en los métodos de la invención puede ser cualquier animal. Como se usa en la presente, el término "mamífero" se refiere a cualquier animal, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden Rodentia, como ratones y hámsteres y mamíferos del
10 orden Logomorpha, como conejos. Se prefiere que los animales sean del orden Carnivora, incluyendo Felinos (gatos) y Caninos (perros). Se prefiere más que los mamíferos sean del orden Artiodactyla, incluyendo Bovinos (vacas) y Cerdos (puercos) o del orden Perssodactyla, incluyendo Equinos
15 (caballos). Se prefiere más que los animales sean del orden Primates, Ceboids o Simoids (monos) o del orden Anthropoids (humanos y simios). Un animal especialmente preferido es el humano.

 [0129] Deberá notarse que los anteriores son
20 simplemente ejemplos de modalidades. Otras modalidades ejemplares son evidentes a partir de la totalidad de la descripción de la presente. También, será comprendido por un experto en el estado de la técnica que cada una de esas modalidades puede utilizarse en varias combinaciones con las
25 otras modalidades proporcionadas en la presente.

[0130] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no deberán interpretarse de ninguna manera como limitantes de su alcance.

5

EJEMPLO 1

[0131] Este ejemplo demuestra el aislamiento de un TCR que tiene especificidad antigénica por el KRAS humano con la mutación G12D.

[0132] El cáncer de endometrial del paciente 4373
 10 progresó después del tratamiento con PBL autólogo transducido con un TCR murino que tiene especificidad antigénica por HLA-A11 restringida, KRAS G12D humana. Se separaron TIL del paciente por su reactividad a KRAS G12D, como sigue. Los TIL de los fragmentos de tumor número F4, F5, F6, F8, F9 y F10 se
 15 cocultivaron con las siguientes células objetivo:

- ARNm de DC autóloga 4373 transfectada con un minigen en tándem (TMG) que codifica para el péptido KRAS TMG natural (WT)
 MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIMTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQETCLLDILDTAG
 20 QEEYSAMRDQYMR (SEQ ID NO: 48);

- ARNm de DC autóloga 4373 transfectado con TMG que codifica para el péptido transmutado (Mut) KRAS:
 MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIMTEYKLVVVGACG
 VGKSALTIQLIMTEYKLVVVGAAGVGKSALTIQLIMTEYKLVVVGASGVGKSALTIQLIMT
 25 EYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGRVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGV

VGKSALTIQLIQETCLLDILDTAGREEYSAMRDQYMRETCLLDILDTAGLEEYSAMRDQYM
RETCLLDILDTAGKEEYSAMRDQYMRETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMR (SEQ ID
NO: 49);

• péptido largo de KRAS WT G12 (LP)
5 (MTEYKLVVVGAGGGVGKSALTIQLI) (SEQ ID NO: 27);

• G12D Mut KRAS LP (MTEYKLVVVGAGDGVGKSALTIQLI) (SEQ
ID NO: 26); o

• epítipo de KRAS mínimo (ME) A11 (G12D 9mérico +
10mérico) VVGAGDGVGK + VVVGAGDGVGK (SEQ ID NO: 28 y 29).

10 [0133] Como controles, las células transducidas se
cultivaron solas (únicamente TIL) o se cultivaron con
sulfóxido de dimetilo (DMSO) o material Dynabeads anti-
CD3/anti-CD28.

[0134] La secreción de interferón-gamma (IFN- γ)
15 después del cocultivo se midió por punto inmunoabsorbente
ligada a enzimas (ELISpot). Los resultados se muestran en la
Figura 1A. El porcentaje de células que expresan 4-1BB y OX40
se midió por ensayo de citometría de flujo. Los resultados se
muestran en la Figura 1B. Como se muestra en las Figuras 1A-
20 1B, los TIL con reactividad anti-G12D se detectaron en el
fragmento de tumor F8.

[0135] Los TIL del fragmento de tumor F8 se
separaron en muestras de una sola célula. Se aisló un TCR con
especificidad antigénica por la KRAS humana con la mutación
25 G12D presentada por HLA-A11 de los TIL. Para secuenciar el

TCR 4373 reactivo, los TIL reactivos se clasificaron por clasificación de celular activada por fluorescencia (FACS) sobre la base de la sobrerregulación del marcador de activación de células T, 4-1BB. Posteriormente, las células se lisaron y los transcritos de TCR se secuenciaron por Sanger. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena α y β del TCR 4373 se muestran en la Tabla 5. Las CDR se encuentran subrayadas.

TABLA 5

Nombre del TCR	Cadena de TCR	Secuencia de Aminoácido
4373 TCR	Región variable de la cadena alfa (TRAV23/DV6*01 o TRAV23/DV6*02 o TRAV23/DV6*03 o TRAV23/DV6*04 + TRAJ18*01) (con péptido señal N-terminal natural)	MDKILGASFLVLWLQLCWVSGQQKEKSDQQQVKQSPQSLIVQKGGISI INCAYENTAFDYFPWYQQFPGKGPALLIAIRPDVSEKKEGRFTISFNKS AKQFSLHIMDSQPGDSATYFCAAEAGNHRGSLGRLYFGRGTQLTVW P (SEQ ID NO: 7)
	Región variable de la cadena alfa (TRAV23/DV6*01 o TRAV23/DV6*02 o TRAV23/DV6*03 o TRAV23/DV6*04 + TRAJ18*01) (con péptido señal N-terminal variante)	MAKILGASFLVLWLQLCWVSGQQKEKSDQQQVKQSPQSLIVQKGGISI INCAYENTAFDYFPWYQQFPGKGPALLIAIRPDVSEKKEGRFTISFNKS AKQFSLHIMDSQPGDSATYFCAAEAGNHRGSLGRLYFGRGTQLTVW P (SEQ ID NO: 51)

Nombre del TCR	Cadena de TCR	Secuencia de Aminoácido
5	Región variable de la cadena beta (TRBV5-1*01 + TRBJ2-1*01) (con péptido señal N-terminal variante)	MASRLLCWLLCLLGAGPVKAGVTQTTPRYLIKTRGQQVTLSCSPIS <u>GH</u> <u>RSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKG</u> NFPGRFSGRQFSNSRSE MNVSTLELGDSALYLC <u>CASSLAAGGYFNEQFFGPGTR</u> LTVL (SEQ ID NO: 8)
10	Región variable de la cadena beta (TRBV5-1*01 + TRBJ2-1*01) (con péptido señal N-terminal natural)	MGSRLLCWLLCLLGAGPVKAGVTQTTPRYLIKTRGQQVTLSCSPIS <u>GH</u> <u>RSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKG</u> NFPGRFSGRQFSNSRSE MNVSTLELGDSALYLC <u>CASSLAAGGYFNEQFFGPGTR</u> LTVL (SEQ ID NO: 52)
15	Alfa (TRAV23/DV6*01 o TRAV23/DV6*02 o TRAV23/DV6*03 o TRAV23/DV6*04 + TRAJ18*01) (secuencia predicha por IMGT sin péptido señal N-terminal)	QQQVKQSPQSLIVQKGGISIINCAYENTAFDYFPWYQQFPGKGPALLIA <u>IRPDVSEKKEGRFTISFNKSAKQFSLHIMDSQPGDSATYFCAAEAGNH</u> <u>RGSTLGR</u> LYFGRGTQLTVWP (SEQ ID NO: 32)
20	Beta (TRBV5-1*01 + TRBJ2-1*01) (secuencia predicha por IMGT sin péptido señal N-terminal)	KAGVTQTTPRYLIKTRGQQVTLSCSPIS <u>GH</u> <u>RSVSWYQQTPGQGLQFLF</u> <u>EYFSETQRNKG</u> NFPGRFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLC <u>ASS</u> <u>LAAGGYFNEQFFGPGTR</u> LTVL (SEQ ID NO: 33)
25	Alfa	QQKEKSDQQQVKQSPQSLIVQKGGISIINCAYENTAFDYFPWYQQFPG

Nombre del TCR	Cadena de TCR	Secuencia de Aminoácido
5	(TRAV23/DV6*01 o TRAV23/DV6*02 o TRAV23/DV6*03 o TRAV23/DV6*04 + TRAJ18*01) (secuencia predicha por SignalP sin péptido señal N- terminal)	KGPALLIAIRPDVSEKKEGRFTISFNKSAKQFSLHIMDSQPGDSATYFC <u>AAEAGNHRGSTLGR</u> LYFGRGTQLTVWP (SEQ ID NO: 59)
10	Beta (TRBV5-1*01 + TRBJ2-1*01) (secuencia predicha por SignalP sin péptido señal N- terminal)	GVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEY_ <u>FSETQRNKG</u> NFPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLELGDSALYLC <u>ASSLA</u> <u>AGGYFNEQFFGPG</u> TRLTVL (SEQ ID NO: 60)
15		

EJEMPLO 2

[0136] Este ejemplo demuestra un método de preparación de un vector retroviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR anti-G12D humano del Ejemplo 1 con regiones constantes murinas modificadas.

[0137] Una secuencia de ácido nucleico que codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D humana del Ejemplo 1 y que incluye una región constante murina modificada con LVL,

sustituida con cisteína se clonó en un vector de expresión retroviral. La región constante murina de la cadena α comprendía la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17 donde X en la posición 48 es Cys, X en la posición 112 es Leu, X en la posición 114 es Ile y X en la posición 115 es Val (SEQ ID NO: 38). La cadena α de longitud completa resultante comprendía la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40. La región constante de la cadena β comprendía la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, donde X en la posición 57 es Cys (SEQ ID NO: 39). La cadena β de longitud completa resultante comprendía la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41. Un enlazante que comprendía la secuencia de aminoácidos de la RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 25) se colocó entre la región constante de la cadena α y la región variable de la cadena β . El vector comprendía un casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 46 (secuencia de nucleótidos optimizada por codones que codifica, del extremo 5' al extremo 3' para: la cadena β de TCR, enlazante, cadena α de TCR), que codificaba para la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 (secuencia de aminoácidos que comprende, desde el amino terminal hasta el carboxilo terminal, la cadena β de TCR, enlazante, la cadena α de TCR).

EJEMPLO 3

[0138] Este ejemplo demuestra que el TCR anti-G12D

del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas) proporciona la misma o mejor reactividad que el TCR anti-G12D murino del Ejemplo 1.

[0139] Los PBL autólogos CD8+ del Paciente 4373 se transdujeron con el vector de expresión retroviral que codifica para (i) el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas) (también denominadas en la presente como "TCR2"), (ii) un segundo TCR (denominado en la presente como "TCR1", el cual también se obtuvo por secuenciamiento de una célula TIL reactivos mostrados en la Figura 1 o (iii) la HLA-A11 restringida, el TCR anti-KRAS G12D del Ejemplo 1 (control). La reactividad de células CD8+ transducidas se probó después del cocultivo con las siguientes células objetivo:

- células transducidas con COS HLA-A2,
- línea celular COS HLA-A2-G12 WT KRAS,
- células transducidas con COS HLA-A11,
- línea celular COS HLA-A11-G12D o
- células T únicamente (sin células objetivo) (-).

[0140] Se midió el porcentaje de células que expresan 4-1BB y OX40 después del cocultivo con células objetivo. Los resultados se muestran en la Figura 2. Las células transducidas también se sometieron a experimentos de titulación del epítipo mínimo de HLA-A11.

[0141] En un experimento separado, los PBL CD8+

autólogas del Paciente 4373 se transdujeron con el vector de expresión retroviral que codifica para (i) el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas), (ii) TCR1, (iii) la HLA-A11 restringida, TCR anti-KRAS G12D murino del Ejemplo 1 o (iv) GFP. Las células transducidas con un vector vacío ("Mock Td" (Td = Transducción)) sirvieron como control adicional. La reactividad de las células CD8+ transducidas se probó después del cocultivo con las siguientes células objetivo:

- 10 • células dendríticas (DC) autólogas transducidas con el gen WT KRAS de longitud completa (FL);
- DC autólogas transducidas con el gen FL KRAS con la mutación G12D;
- DC autólogas transducidas con WT KRAS LP
15 (MTEYKLVVVGAGGGVGKSALTIQLI) (SEQ ID NO: 27);
- DC autólogas transducidas con G12D Mut KRAS LP (MTEYKLVVVGADGGVGKSALTIQLI) (SEQ ID NO: 26);
- epítipo de KRAS mínimo (ME) A02 WT;
- ME A02 G12D KLVVVGADGV (SEQ ID NO: 50);
- 20 • mezcla de ME HLA-A11 WT (mezcla de péptidos de la SEQ ID NO: 30 de WT 9-mérico y WT 10-mérico SEQ ID NO: 31); o
- mezcla de ME HLA-A11 G12D (mezcla de péptidos de la SEQ ID NO: 28 G12D 9-mérico y G12D 10-mérico SEQ ID NO: 29).
- 25 [0142] Como control, las células transducidas se

cultivaron solas (células T únicamente) o se cocultivaron con DMSO o material DYNABEADS anti-CD28/anti-CD3. La secreción de IFN- γ se midió por ELISpot. Los resultados se muestran en la Figura 3A y la Tabla 6. Se midieron los porcentajes de células que expresan 4-1BB y OX40. Los resultados se muestran en la Figura 3B.

TABLA 6

	TCR 43731	TCR 43732	mTCR (G12D-A11)
FL WT	178	232	164
FL G12D	232	1095	976
LP WT	144	186	205
LP G12D	184	1223	1143
ME A*02 WT	167	200	196
ME A*02 G12D	157	234	188
Mezcla ME A*11 WT	201	217	211
Mezcla ME A*11 G12D	203	1371	1373
DMSO	168	253	194
Únicamente células T	186	187	219
Dynabeads CD3/CD28	1032	1022	1155

[0143] En un experimento separado, los PBL autólogos del Paciente 4373 se transdujeron con el vector de expresión retroviral que codifica para (i) el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas) o (ii) la HLA-A11 restringida, el TCR anti-KRAS G12D

murino del Ejemplo 1.

[0144] Las DC autólogas se cargaron con los siguientes péptidos a las concentraciones mostradas en la Tabla 7: un péptido de epítipo mínimo mutado (ME) con 9 residuos de aminoácido (VVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 28), un péptido de epítipo mínimo mutado con 10 residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29), un péptido de epítipo mínimo WT con 9 residuos de aminoácido (VVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 30) o un péptido de epítipo mínimo WT con 10 residuos de aminoácido (VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31). La secreción de IFN- γ se midió por ELISpot. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

DC cargadas con el péptido			10000 ng	1000 ng	100 ng	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng
A11 – ME									
mTCR	ME 9mérico	WT	224	256	220	228	228	204	212
		G12D	235	236	255	289	243	249	267
	ME 10mérico	WT	254	229	256	228	231	258	262
		G12D	1349	1096	735	401	292	288	234
4373 TCR2	ME 9mérico	WT	282	277	300	284	275	286	253
		G12D	515	308	272	290	266	301	286
	ME 10mérico	WT	273	256	237	251	282	293	275

DC cargadas con el péptido A11 – ME			10000 ng	1000 ng	100 ng	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng
		G12D	1532	1395	1037	495	298	264	245

[0145] Como se muestra en las Figuras 2-3B y las
 5 Tablas 6-7, el TCR anti-G12D del Ejemplo 2 (con regiones
 variables humanas) proporcionó la misma o mejor reactividad
 que el TCR anti-G12D murino del Ejemplo 1.

EJEMPLO 4

[0146] Este ejemplo demuestra que los PBL
 10 transducidas con el TCR anti-G12D del Ejemplo 2 (con regiones
 variables humanas) reconoce específicamente la G12D con HLA-
 A11 restringido con alta avidez.

[0147] Los PBL autólogos del Paciente 4373 se
 transdujeron con el vector de expresión retroviral que
 15 codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2
 (con regiones variables humanas).

[0148] Las DC autólogas se cargaron con los
 siguientes péptidos a las concentraciones mostradas en la
 Figura 4A: un péptido de epítipo mínimo mutado con 10
 20 residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) o un
 péptido de epítipo mínimo WT con 10 residuos de aminoácido
 (VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31). La secreción de IFN- γ se midió
 por ELISpot. Los resultados se muestran en la Figura 4A.

EJEMPLO 5

[0149] Este ejemplo demuestra que los PBL CD8+

transducidas con el TCR anti-G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas) reconoce específicamente G12D con HLA-A11 restringido con alta avidéz.

5 [0150] Los PBL CD8+ autólogas del Paciente 4373 se transdujeron con el vector de expresión retroviral que codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas).

10 [0151] Las DC autólogas se cargaron con los siguientes péptidos a las concentraciones mostradas en la Figura 4B: un péptido de epítipo mínimo mutado con 10 residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) o un péptido de epítipo mínimo WT con 10 residuos de aminoácido (VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31). La expresión de 4-1BB y OX40 se midió por FACS. Los resultados se muestran en la Figura 4B.

15

EJEMPLO 6

[0152] Este ejemplo demuestra que los PBL CD4+ transducidas con el TCR anti-G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas) reconoce específicamente G12D con HLA-A11 restringido con alta avidéz.

20

[0153] Los PBL CD4+ autólogas del Paciente 4373 se transdujeron con el vector de expresión retroviral que codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas).

25

[0154] Las DC autólogas se cargaron con los siguientes péptidos a las concentraciones mostradas en la

Figura 4C: un péptido de epítipo mínimo mutado con 10
residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) o un
péptido de epítipo mínimo WT con 10 residuos de aminoácido
(VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31). La expresión de 4-1BB y OX40 se
5 midió por FACS. Los resultados se muestran en la Figura 4C.

EJEMPLO 7

[0155] Este ejemplo demuestra que los PBL CD8+
transducidas con el TCR anti-G12D del Ejemplo 2 (con regiones
variables humanas) reconoce específicamente G12D con HLA-A11
10 restringido con alta avidéz.

[0156] Los PBL CD8+ autólogas del Paciente 4373 se
transdujeron con el vector de expresión retroviral que
codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2
(con regiones variables humanas).

15 [0157] Las células COS se cargaron con los
siguientes péptidos a las concentraciones mostradas en la
Figura 5A: un péptido de epítipo mínimo mutado con 10
residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) o un
péptido de epítipo mínimo WT con 10 residuos de aminoácido
20 (VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31). La secreción de IFN- γ se midió
por ELISpot. Los resultados se muestran en la Figura 5A.

EJEMPLO 8

[0158] Este ejemplo demuestra que los PBL CD8+
transducidas con el TCR anti-G12D del Ejemplo 2 (con regiones
variables humanas) reconoce específicamente G12D con HLA-A11
25

restringido con alta avidéz.

[0159] Los PBL CD8+ autólogas del Paciente 4373 se transdujeron con el vector de expresión retroviral que codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2
5 (con regiones variables humanas).

[0160] Las células COS se transdujeron con HLA-A11 y se cargaron con los siguientes péptidos a las concentraciones mostradas en la Figura 5B: un péptido de epítipo mínimo mutado con 10 residuos de aminoácido
10 (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) o un péptido de epítipo mínimo WT con 10 residuos de aminoácido (VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31). La expresión de 4-1BB y OX40 se midió por FACS. Los resultados se muestran en la Figura 5B.

EJEMPLO 9

[0161] Este ejemplo demuestra que los PBL CD4+ transducidas con el TCR anti-G12D del Ejemplo 2 (con regiones variables humanas) reconoce específicamente G12D con HLA-A11 restringido con alta avidéz.
15

[0162] Los PBL CD4+ autólogas del Paciente 4373 se transdujeron con el vector de expresión retroviral que codifica para el TCR 4373 reactivo con RAS G12D del Ejemplo 2
20 (con regiones variables humanas).

[0163] Las células COS se cargaron con los siguientes péptidos a las concentraciones mostradas en la
25 Figura 5C: un péptido de epítipo mínimo mutado con 10

residuos de aminoácido (VVVGADDGVGK) (SEQ ID NO: 29) o un péptido de epítipo mínimo WT con 10 residuos de aminoácido (VVVGAGGGVGK) (SEQ ID NO: 31). La expresión de 4-1BB y OX40 se midió por FACS. Los resultados se muestran en la Figura 5C.

5 [0164] Todas las referencias, incluyendo las publicaciones, solicitudes de patentes y patentes, citadas en la presente se incorporan por lo tanto como referencia en el mismo grado como si cada referencia fuera indicada individual y específicamente como incorporada como referencia y fuera
10 expuesta en su totalidad en la presente.

[0165] El uso de los términos "un" y "uno" y "el" y "al menos uno" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse como si
15 cubrieran tanto el singular como el plural, a menos que se indique otra cosa en la presente o sea contradicho claramente por el contexto. El uso del término "al menos uno" seguido por una lista de uno o más elementos (por ejemplo, "al menos uno de A y B") debe interpretarse como si significara un
20 elemento seleccionado de los elementos listados (A o B) o cualquiera combinación de dos o más de los elementos listados (A y B), a menos que se indique otra cosa en lo presente o sea contradicho claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben
25 interpretarse como términos abiertos (es decir, que

significan "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se señale otra cosa. La cita de intervalos de valores en la presente pretende simplemente servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado caiga dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en lo presente y cada valor separado se incorpora en la especificación como si fuera citado individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente pueden efectuarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en la presente o sea claramente contradicho por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "como") proporcionado en la presente, pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no posee una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reclame otra cosa. Ningún lenguaje en la especificación deberá interpretarse como si indicara cualquier elemento no reclamado como esencial para la práctica de la invención.

[0166] Las modalidades preferidas de esta invención se describen en la presente, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de aquellas modalidades preferidas pueden volverse evidentes a aquellos expertos en el estado de la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen esas variantes

según sea apropiado y los inventores pretenden que la invención sea practicada de otro modo a la descrita específicamente en la presente. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia citada en las reivindicaciones anexas a esta de acuerdo a lo permitido por las leyes aplicables. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de los mismos es abarcada por la invención a menos que se indique otra cosa en la presente o sea claramente contradicho por el contexto.

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de células T (TCR) asilado y purificado que comprende todas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-3, 4-6 o 1-6, donde el TCR
5 tiene especificidad antigénica por una secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico,

donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una secuencia de aminoácidos de un homólogo del
10 oncogén viral del sarcoma de rata de Kristen (KRAS) humana mutada, un homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Harvey (HRAS) humana mutada o un homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Neuroblastoma (HRAS) humana mutada y

donde la posición 12 se define con referencia a la
15 proteína KRAS humana natural, la HRAS humana natural o la NRAS humana natural, respectivamente.

2. El TCR aislado y purificado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es VVGADGVGK (SEQ ID NO: 29).

20 3. El TCR aislado y purificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el TCR no tiene especificidad antigénica por la secuencia de aminoácidos de RAS humana natural de VVGAGGVGK (SEQ ID NO: 31).

4. El TCR aislado y purificado de acuerdo con
25 cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la secuencia de

aminoácidos de RAS humana mutada es presentada por una molécula de la Clase I de antígeno leucocitario humano (HLA).

5 5. El TCR aislado y purificado de acuerdo con la reivindicación 4, donde la molécula HLA de la Clase I es una molécula HLA-A.

6. El TCR aislado y purificado de acuerdo con la reivindicación 4, donde la molécula HLA de la Clase I es una molécula HLA-A11.

10 7. El TCR aislado y purificado de acuerdo con la reivindicación 4, donde la molécula HLA de la Clase I es codificada por el alelo HLA-A*11:01.

8. El TCR aislado y purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:

15 (i) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

(ii) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

(iii) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51;

20 (iv) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52;

(v) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32;

25 (vi) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33;

(vii) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59;

(viii) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60; o

5 (ix) ambas de (i) y (ii), ambas de (i) y (iv),
ambas de (ii) y (iii), ambas de (iii) y (iv), ambas de (v) y
(vi), ambas de (v) y (viii), ambas de (vi) y (vii) o ambas de
(vii) y (viii).

9. El TCR aislado y purificado de acuerdo con
10 cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende:

(i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

(ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
8;

(iii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
15 51;

(iv) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
52;

(v) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
32;

20 (vi) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
33;

(vii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
59;

(viii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:
25 60; o

(ix) ambas de (i) y (ii), ambas de (i) y (iv), ambas de (ii) y (iii), ambas de (iii) y (iv), ambas de (v) y (vi), ambas de (v) y (viii), ambas de (vi) y (vii) o ambas de (vii) y (viii).

5 10. El TCR aislado y purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además:

(a) una región constante de la cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, donde:

10 (i) X en la posición 48 de la SEQ ID NO: 17 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 112 de la SEQ ID NO: 17 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

15 (iii) X en la posición 114 de la SEQ ID NO: 17 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 115 de la SEQ ID NO: 17 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

20 (b) una región constante de la cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, donde X en la posición 57 de la SEQ ID NO: 18 es Ser o Cys; o

(c) ambas de (a) y (b).

25 11. El TCR aislado y purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además:

(a) una región constante de la cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, donde:

5 (i) X en la posición 48 de la SEQ ID NO: 17 es Thr o Cys;

 (ii) X en la posición 112 de la SEQ ID NO: 17 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

 (iii) X en la posición 114 de la SEQ ID NO: 17 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

10 (iv) X en la posición 115 de la SEQ ID NO: 17 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una región constante de la cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, donde X en la posición 57 de la SEQ ID NO: 18 es Ser o Cys; o

15 (c) ambas de (a) y (b).

12. El TCR aislado y purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende:

20 (a) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde:

 (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys;

 (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

25 (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es

Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys;

(c) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(d) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys;

(e) ambas de (a) y (b), ambas de (a) y (d), ambas de (b) y (c) o ambas de (c) y (d);

(f) una cadena α que comprende una secuencia de

aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde:

(i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys;

5 (ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

10 (iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(g) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys;

15 (h) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde:

(i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr o Cys;

20 (ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

25 (iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(i) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde X en la posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys;

5 (j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i);

(k) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;

10 (l) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;

(m) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;

15 (n) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64;

20 (o) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42;

(p) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

25 (q) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 65;

(r) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66;

5 (s) ambas de (k) y (l), ambas de (m) y (n), ambas de (o) y (p) o ambas de (q) y (r);

(t) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

10 (u) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

(v) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55;

15 (w) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56;

(x) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;

20 (y) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;

25 (z) una cadena α que comprende una secuencia de

aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57;

(aa) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; o

(ab) ambas de (t) y (u), ambas de (t) y (w), ambas de (u) y (v), ambas de (v) y (w), ambas de (x) y (y), ambas de (x) y (aa), ambas de (y) y (z) o ambas de (z) y (aa).

13. El TCR aislado y purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende:

(a) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys;

(c) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

5 (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(d) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys;

(e) ambas de (a) y (b), ambas de (a) y (d), ambas de (b) y (c) o ambas de (c) y (d);

(f) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde:

(i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

20 (iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(g) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición 172

de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys;

(h) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde:

5 (i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

10 (iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(i) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde X en la posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys;

15 (j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i);

(k) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;

(l) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;

20 (m) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;

(n) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64;

25 (o) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42;

(p) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

(q) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65;

5 (r) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66;

(s) ambas de (k) y (l), ambas de (m) y (n), ambas de (o) y (p) o ambas de (q) y (r);

10 (t) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

(u) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

(v) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55;

15 (w) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56;

(x) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;

20 (y) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;

(z) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57;

(aa) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; o

25 (ab) ambas de (t) y (u), ambas de (t) y (w), ambas

de (u) y (v), ambas de (v) y (w), ambas de (x) y (y), ambas de (x) y (aa), ambas de (y) y (z) o ambas de (z) y (aa).

14. Un polipéptido aislado o purificado que comprende una porción funcional del TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde la porción funcional comprende las secuencias de aminoácidos de:

- (a) todas de las SEQ ID NOs: 1-3,
- (b) todas de las SEQ ID NOs: 4-6 o
- (c) todas de las SEQ ID NOs: 1-6.

15. El polipéptido aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 14, donde la porción funcional comprende:

- (i) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;
- (ii) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;
- (iii) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51;
- (iv) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52;
- (v) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32;
- (vi) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33;
- (vii) una secuencia de aminoácidos al menos 99%

idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59;

(viii) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60; o

(ix) ambas de (i) y (ii), ambas de (i) y (iv),
5 ambas de (ii) y (iii), ambas de (iii) y (iv), ambas de (v) y
(vi), ambas de (v) y (viii), ambas de (vi) y (vii) o ambas de
(vii) y (viii).

16. El polipéptido aislado o purificado de acuerdo
con la reivindicación 14 o 15, donde la porción funcional
10 comprende las secuencias de aminoácidos de:

(i) la SEQ ID NO: 7;
(ii) la SEQ ID NO: 8;
(iii) la SEQ ID NO: 51;
(iv) la SEQ ID NO: 52;
15 (v) la SEQ ID NO: 32;
(vi) la SEQ ID NO: 33;
(vii) la SEQ ID NO: 59;
(viii) la SEQ ID NO: 60; o
(ix) ambas de (i) y (ii), ambas de (i) y (iv),
20 ambas de (ii) y (iii), ambas de (iii) y (iv), ambas de (v) y
(vi), ambas de (v) y (viii), ambas de (vi) y (vii) o ambas de
(vii) y (viii).

17. El polipéptido aislado o purificado de acuerdo
con cualquiera de las reivindicaciones 14-16, que comprende
25 además:

(a) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, donde:

5 (i) X en la posición 48 de la SEQ ID NO: 17 es Thr o Cys;

 (ii) X en la posición 112 de la SEQ ID NO: 17 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

 (iii) X en la posición 114 de la SEQ ID NO: 17 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

10 (iv) X en la posición 115 de la SEQ ID NO: 17 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, donde X en la posición 57 de la SEQ ID NO: 18 es Ser o Cys; o

15 (c) ambas de (a) y (b).

18. El polipéptido aislado o purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-17, que comprende además:

20 (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, donde:

 (i) X en la posición 48 de la SEQ ID NO: 17 es Thr o Cys;

 (ii) X en la posición 112 de la SEQ ID NO: 17 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

25 (iii) X en la posición 114 de la SEQ ID NO: 17 es

Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 115 de la SEQ ID NO: 17 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, donde X en la posición 57 de la SEQ ID NO: 18 es Ser o Cys; o

(c) ambas de (a) y (b).

19. El polipéptido aislado o purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-18, que comprende:

10 (a) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys;

15 (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

20 (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys;

25 (c) una cadena α que comprende una secuencia de

aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys;

5 (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

10 (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(d) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys;

15 (e) ambas de (a) y (b), ambas de (a) y (d), ambas de (b) y (c) o ambas de (c) y (d);

(f) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde:

20 (i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

25 (iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(g) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys;

(h) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde:

(i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(i) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde X en la posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys;

(j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i);

(k) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;

(l) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;

5 (m) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;

(n) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64;

10 (o) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42;

(p) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

15 (q) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65;

(r) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66;

(s) ambas de (k) y (l), ambas de (m) y (n), ambas de (o) y (p) o ambas de (q) y (r);

25 (t) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

(u) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

5 (v) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55;

(w) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56;

(x) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;

15 (y) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;

(z) una cadena α que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57;

20 (aa) una cadena β que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; o

(ab) ambas de (t) y (u), ambas de (t) y (w), ambas de (u) y (v), ambas de (v) y (w), ambas de (x) y (y), ambas de (x) y (aa), ambas de (y) y (z) o ambas de (z) y (aa).

20. El polipéptido aislado o purificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-19, que comprende:

(a) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde:

5 (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

10 (iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

15 (b) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys;

(c) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys;

20 (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

25 (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(d) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys;

5 (e) ambas de (a) y (b), ambas de (a) y (d), ambas de (b) y (c) o ambas de (c) y (d);

(f) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde:

(i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys;

10 (ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

15 (iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(g) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys;

20 (h) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde:

(i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

25 (iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es

Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

5 (i) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde X en la posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys;

(j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i);

(k) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;

10 (l) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;

(m) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;

15 (n) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64;

(o) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42;

(p) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

20 (q) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65;

(r) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66;

25 (s) ambas de (k) y (l), ambas de (m) y (n), ambas de (o) y (p) o ambas de (q) y (r);

(t) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

(u) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

5 (v) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55;

(w) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56;

10 (x) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;

(y) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;

(z) una cadena α que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57;

15 (aa) una cadena β que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; o

(ab) ambas de (t) y (u), ambas de (t) y (w), ambas de (u) y (v), ambas de (v) y (w), ambas de (x) y (y), ambas de (x) y (aa), ambas de (y) y (z) y ambas de (z) y (aa).

20 21. Una proteína aislada o purificada, que comprende una primera cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1-3 y una segunda cadena polipeptídica que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4-6.

25 22. La proteína aislada o purificada de acuerdo con

la reivindicación 21, donde

(i) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

5 (ii) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

(iii) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia
10 de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51;

(iv) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52;

(v) la primera cadena polipeptídica comprende una
15 secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32;

(vi) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33;

20 (vii) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59;

(viii) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la
25 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60; o

(ix) ambas de (i) y (ii), ambas de (i) y (iv),
 ambas de (ii) y (iii), ambas de (iii) y (iv), ambas de (v) y
 (vi), ambas de (v) y (viii), ambas de (vi) y (vii) o ambas de
 (vii) y (viii).

5 23. La proteína aislada o purificada de acuerdo con
 la reivindicación 21 o 22, donde:

(i) la primera cadena polipeptídica comprende la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

10 (ii) una segunda cadena polipeptídica comprende la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

(iii) la primera cadena polipeptídica comprende la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51;

(iv) una segunda cadena polipeptídica comprende la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52;

15 (v) la primera cadena polipeptídica comprende la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32;

(vi) una segunda cadena polipeptídica comprende la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33;

20 (vii) la primera cadena polipeptídica comprende la
 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59;

(viii) una segunda cadena polipeptídica comprende
 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60; o

25 (ix) ambas de (i) y (ii), ambas de (i) y (iv),
 ambas de (ii) y (iii), ambas de (iii) y (iv), ambas de (v) y
 (vi), ambas de (v) y (viii), ambas de (vi) y (vii) o ambas de

(vii) y (viii).

24. La proteína aislada o purificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-23, donde:

(a) la primera cadena polipeptídica comprende
5 además una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, donde:

(i) X en la posición 48 de la SEQ ID NO: 17 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 112 de la SEQ ID NO: 17 es
10 Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 114 de la SEQ ID NO: 17 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 115 de la SEQ ID NO: 17 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una segunda cadena polipeptídica comprende
15 además una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, donde X en la posición 57 de la SEQ ID NO: 18 es Ser o Cys; o

(c) ambas de (a) y (b).

20 25. La proteína aislada o purificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-24, donde:

(a) la primera cadena polipeptídica comprende además la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, donde:

25 (i) X en la posición 48 de la SEQ ID NO: 17 es Thr

o Cys;

(ii) X en la posición 112 de la SEQ ID NO: 17 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 114 de la SEQ ID NO: 17 es
5 Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 115 de la SEQ ID NO: 17 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una segunda cadena polipeptídica comprende además la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, donde
10 X en la posición 57 de la SEQ ID NO: 18 es Ser o Cys; o

(c) ambas de (a) y (b).

26. La proteína aislada o purificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-25, donde:

(a) la primera cadena polipeptídica comprende una
15 secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es
20 Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

25 (b) una segunda cadena polipeptídica comprende una

secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys;

5 (c) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys;

10 (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

15 (d) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys;

20 (e) ambas de (a) y (b), ambas de (a) y (d), ambas de (b) y (c) o ambas de (c) y (d);

(f) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde:

25 (i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

5 (iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(g) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición
10 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys;

(h) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde:

(i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr
15 o Cys;

(ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

20 (iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(i) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde X en la posición
25 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys;

(j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i);

(k) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;

5 (l) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;

10 (m) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;

(n) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64;

15 (o) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42;

(p) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

20 (q) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65;

25 (r) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66;

(s) ambas de (k) y (l), ambas de (m) y (n), ambas de (o) y (p) o ambas de (q) y (r);

(t) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

(u) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

(v) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55;

(w) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56;

(x) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;

(y) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;

(z) la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57;

(aa) una segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; o

(ab) ambas de (t) y (u), ambas de (t) y (w), ambas de (u) y (v), ambas de (v) y (w), ambas de (x) y (y), ambas de (x) y (aa), ambas de (y) y (z) o ambas de (z) y (aa).

5 27. La proteína aislada o purificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-26, donde:

(a) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, donde:

10 (i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 21 es Thr o Cys;

(ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 21 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 21 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

15 (iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 21 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(b) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 22 es Ser o Cys;

20 (c) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, donde:

(i) X en la posición 193 de la SEQ ID NO: 53 es Thr o Cys;

25 (ii) X en la posición 257 de la SEQ ID NO: 53 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 259 de la SEQ ID NO: 53 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 260 de la SEQ ID NO: 53 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

5 (d) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45, donde X en la posición 191 de la SEQ ID NO: 54 es Ser o Cys;

(e) ambas de (a) y (b), ambas de (a) y (d), ambas de (b) y (c) o ambas de (c) y (d);

10 (f) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34, donde:

(i) X en la posición 165 de la SEQ ID NO: 34 es Thr o Cys;

15 (ii) X en la posición 229 de la SEQ ID NO: 34 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 231 de la SEQ ID NO: 34 es Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 232 de la SEQ ID NO: 34 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

20 (g) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 35 es Ser o Cys;

(h) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, donde:

25 (i) X en la posición 172 de la SEQ ID NO: 61 es Thr

o Cys;

(ii) X en la posición 236 de la SEQ ID NO: 61 es Ser, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(iii) X en la posición 238 de la SEQ ID NO: 61 es
5 Met, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe o Trp; y

(iv) X en la posición 239 de la SEQ ID NO: 61 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met o Trp;

(i) una segunda cadena polipeptídica comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde X en la
10 posición 170 de la SEQ ID NO: 62 es Ser o Cys;

(j) ambas de (f) y (g) o ambas de (h) y (i);

(k) la primera cadena polipeptídica comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36;

(l) una segunda cadena polipeptídica comprende la
15 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37;

(m) la primera cadena polipeptídica comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63;

(n) una segunda cadena polipeptídica comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64;

(o) la primera cadena polipeptídica comprende la
20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42;

(p) una segunda cadena polipeptídica comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43;

(q) la primera cadena polipeptídica comprende la
25 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65;

(r) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66;

(s) ambas de (k) y (l), ambas de (m) y (n), ambas de (o) y (p) o ambas de (q) y (r);

5 (t) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

(u) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

10 (v) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55;

(w) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56;

(x) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40;

15 (y) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;

(z) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57;

20 (aa) una segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; o

(ab) ambas de (t) y (u), ambas de (t) y (w), ambas de (u) y (v), ambas de (v) y (w), ambas de (x) y (y), ambas de (x) y (aa), ambas de (y) y (z) o ambas de (z) y (aa).

25 28. Un ácido nucleico aislado o purificado que comprende a secuencia de nucleótidos que codifica para el TCR

de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-20 o la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-27.

5 29. Un ácido nucleico aislado o purificado que comprende, de 5' a 3', una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de nucleótidos, donde la primera y segunda secuencia de nucleótidos, respectivamente, codifican para las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID
10 NOs: 7 y 8; 51 y 8; 7 y 52; 51 y 52; 8 y 7; 8 y 51; 52 y 7; 52 y 51; 21 y 22; 53 y 22; 21 y 54; 53 y 54; 22 y 21; 22 y 53; 54 y 21; 54 y 53; 23 y 24; 55 y 24; 23 y 56; 55 y 56; 24 y 23; 24 y 55; 56 y 23; 56 y 55; 32 y 33; 33 y 32; 59 y 60; 60 y 59; 34 y 35; 35 y 34; 61 y 62; 62 y 61; 36 y 37; 37 y
15 36; 63 y 64; 64 y 63; 40 y 41; 57 y 41; 40 y 58; 57 y 58; 41 y 40; 41 y 57; 58 y 40; 58 y 57; 42 y 43; 43 y 42; 65 y 66; o 66 y 65.

 30. El ácido nucleico aislado o purificado de acuerdo con la reivindicación 29, que comprende además una
20 tercera secuencia de nucleótidos interpuesta entre la primera y segunda secuencia de nucleótidos, donde la tercera secuencia de nucleótidos codifica para un péptido enlazante escindible.

 31. El ácido nucleico aislado o purificado de
25 acuerdo con la reivindicación 30, donde el péptido enlazante

escindible comprende la secuencia de aminoácidos de la RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 25).

5 32. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31.

33. El vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 32, el cual es un transposón o un vector lentiviral.

10 34. Un TCR, polipéptido o proteína aislado o purificado codificado por el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31 o el vector de acuerdo con la reivindicación 32 o 33.

15 35. Un TCR, polipéptido o proteína aislado o purificado que resulta de la expresión del ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31 o el vector de acuerdo con la reivindicación 32 o 33 en una célula.

20 36. Un método de producción de una célula anfitriona que expresa un TCR que tiene especificidad antigénica por el péptido de la VVVGADGVGK (SEQ ID NO: 29), el método comprende poner en contacto una célula con el vector de acuerdo con la reivindicación 32 o 33 bajo condiciones que permiten la introducción del vector en la célula.

25 37. Una célula anfitriona aislada o purificada que

comprende el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31 o el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 32 o 33.

38. La célula anfitriona de acuerdo con la
5 reivindicación 37, donde la célula es un linfocito humano.

39. La célula anfitriona de acuerdo con la
reivindicación 37 o 38, donde la célula se selecciona de una
célula T, una célula T asesina natural (NKT), una célula T
asesina natural invariante (iNKT) y una célula asesina
10 natural (NK).

40. Una población aislada o purificada de células
que comprende la célula anfitriona de acuerdo con cualquiera
de las reivindicaciones 37-39.

41. Un método de producción del TCR de acuerdo con
15 cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 34 o 35, el
polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
14-20, 34 o 35 o la proteína de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 21-27, 34 o 35, el método comprende cultivar
la célula anfitriona de acuerdo con cualquiera de las
20 reivindicaciones 37-39 o la población de células anfitrionas
de acuerdo con la reivindicación 40, de modo que se produzca
el TCR, polipéptido o proteína.

42. Una composición farmacéutica que comprende (a)
el TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-
25 13, 34 o 35, el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 14-20, 34 o 35, la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-27, 34 o 35, el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la
5 reivindicación 32 o 33, la célula anfitriona de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37-39 o la población de células de acuerdo con la reivindicación 40 y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

43. Un método de detección de la presencia de
10 cáncer en un mamífero, el método que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que comprende células del cáncer con el TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 34 o 35, el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-20, 34 o 35, la
15 proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-27, 34 o 35, el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 32 o 33, la célula anfitriona de acuerdo con cualquiera de las
20 reivindicaciones 37-39, la población de células de acuerdo con la reivindicación 40 o la composición farmacéutica de la reivindicación 42, formando por lo tanto un complejo; y

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

44. El TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 34 o 35, el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-20, 34 o 35, la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-27, 34 o 35, el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 32 o 33, la célula anfitriona de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37-39, la población de células de acuerdo con la reivindicación 40 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 42 para usarse en la inducción de una respuesta inmune contra el cáncer en un mamífero.

45. El TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 34 o 35, el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-20, 34 o 35, la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-27, 34 o 35, el ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 32 o 33, la célula anfitriona de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37-39, la población de células de acuerdo con la reivindicación 40 o la composición farmacéutica de la reivindicación 42 para usarse en el tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero.

46. El método de acuerdo con la reivindicación 43 o

el TCR, polipéptido, proteína, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula anfitriona, población de células o composición farmacéutica para usarse de acuerdo con la reivindicación 44 o 45, donde el cáncer expresa una
5 secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico,
donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una secuencia de aminoácidos de un homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kristen (KRAS) humana
10 mutada, un homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Harvey (HRAS) humana mutada o a homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Neuroblastoma (HRAS) humana mutada y
donde la posición 12 se define con referencia a la proteína KRAS humana natural, la HRAS humana natural o la
15 NRAS humana natural, respectivamente.

47. El método o el TCR, polipéptido, proteína, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula anfitriona, población de células o composición farmacéutica para usarse de acuerdo con la reivindicación 46, donde la
20 secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una secuencia de aminoácidos del homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kristen (NRAS) humana mutada.

48. El método o el TCR, polipéptido, proteína, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula
25 anfitriona, población de células o composición farmacéutica

para usarse de acuerdo con la reivindicación 46, donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una secuencia de aminoácidos del homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de neuroblastoma (NRAS) humana mutada.

5 49. El método o el TCR, polipéptido, proteína, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula anfitriona, población de células o composición farmacéutica para usarse de acuerdo con la reivindicación 46, donde la secuencia de aminoácidos de RAS humana mutada es una
10 secuencia de aminoácidos del homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Harvey (HRAS) humana mutada.

 50. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 o 46-49 o el TCR, polipéptido, proteína, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula
15 anfitriona, población de células o composición farmacéutica para usarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 44-49, donde el cáncer es cáncer pancreático, colorrectal, de pulmón, endometrial, de ovario o de próstata.

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe un receptor de célula T (TCR) aislado y purificado, donde el TCR tiene especificidad antigénica por una secuencia de aminoácidos RAS humana mutada con una sustitución de glicina en la posición 12 con ácido aspártico presentada por una molécula de antígeno leucocitario humano (HLA) de la Clase I. También se proporcionan polipéptidos y proteínas relacionadas, así como los ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinantes, células anfitrionas, poblaciones de células y composiciones farmacéuticas. También se describen métodos para detectar la presencia de cáncer en un mamífero y métodos de tratamiento y prevención del cáncer en un mamífero.

15

20

25