

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 986 840**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2018 PCT/EP2018/057482**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2018 WO18172533**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2018 E 18715559 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3600409**

(54) Título: **Receptores de células T y terapia inmunológica utilizando los mismos contra cánceres positivos para PRAME**

(30) Prioridad:

**23.03.2017 DE 102017106305
23.03.2017 US 201762475329 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2024

(73) Titular/es:

**IMMATICCS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE**

(72) Inventor/es:

**ALTEN, LEONIE;
MAURER, DOMINIK;
BUNK, SEBASTIAN;
WAGNER, CLAUDIA y
FERBER, MATHIAS**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 840 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de células T y terapia inmunológica utilizando los mismos contra cánceres positivos para PRAME

La presente invención se refiere a construcciones de reconocimiento del antígeno contra antígenos asociados a tumores (TAA), en particular contra el antígeno expresado preferencialmente del melanoma (PRAME). En particular, la invención proporciona novedosas moléculas basadas en el receptor de células T (TCR) que son selectivas y específicas para el antígeno expresado en el tumor de la invención. El TCR de la invención, y los fragmentos de unión a TAA derivados del mismo, son de utilidad para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades cancerígenas que expresan TAA. Se proporcionan adicionalmente ácidos nucleicos que codifican para las construcciones de reconocimiento del antígeno de la invención, vectores que comprenden estos ácidos nucleicos, células recombinantes que expresan las construcciones de reconocimiento del antígeno y composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención.

Descripción

PRAME está codificado por el gen PRAME, que se expresa a un alto nivel en una gran proporción de tumores, incluyendo melanomas, carcinomas pulmonares de células no pequeñas, carcinoma de ovario, carcinoma de células renales (RCC), carcinoma de mama, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de colon, sarcoma, neuroblastoma, así como diversos tipos de leucemia. PRAME es el miembro mejor caracterizado de la familia PRAME de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR). Los genomas de mamíferos contienen múltiples miembros de la familia PRAME, mientras que en otros genomas de vertebrados sólo se identificó una proteína LRR tipo PRAME. PRAME es un antígeno de cáncer/testículos que se expresa a niveles muy bajos en tejidos adultos normales, excepto testículos, pero a niveles elevados en una variedad de células cancerosas.

Las dianas de la inmunoterapia basada en células T representan epítopes peptídicos derivados de proteínas asociadas a tumor o específicas de tumor, que son presentadas por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estos antígenos asociados a tumores (TAAs) pueden ser péptidos derivados de todas las clases de proteínas, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que se expresan y, en comparación con las células inalteradas del mismo origen, suelen estar regulados positivamente en las células del tumor respectivo.

Elementos específicos de la respuesta inmune celular son capaces de reconocer y destruir específicamente a las células tumorales. El aislamiento de células T a partir de poblaciones de células infiltrantes de tumores o de sangre periférica sugiere que dichas células juegan un papel importante en la defensa inmune natural contra el cáncer. En particular, las células T CD8 positivas, que reconocen a las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos de usualmente 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o productos ribosomales defectuosos (DRiPs) localizadas en el citosol, juegan un papel importante en esta respuesta. Las moléculas del MHC de humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas del MHC, MHC de clase I y MHC de clase II. Los complejos de péptidos y MHC de clase I son reconocidos por las células T CD8 positivas que portan el receptor de células T (TCR) adecuado, mientras que los complejos de péptidos y moléculas del MHC de clase II son reconocidos por las células T auxiliares CD4 positivas que portan el TCR adecuado. Dado que ambos tipos de respuesta, dependiente de CD8 y CD4, contribuyen de forma conjunta y sinérgica al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumores y de los correspondientes receptores de células T es importante en el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer, como vacunas y terapias celulares.

En la reacción inmune dependiente del MHC de clase I, los péptidos no sólo tienen que ser capaces de unirse a determinadas moléculas del MHC de clase I expresadas por las células tumorales, sino que posteriormente también tienen que ser reconocidas por células T portadoras de receptores de células T (TCR) específicos. Por lo tanto, los TAAs son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en células T que incluye, pero no se limita a, vacunas contra tumores y terapias celulares.

Aproximadamente el 90 por ciento de las células T de sangre periférica expresan un TCR que consiste en un polipéptido α y un polipéptido β. Se ha demostrado que un pequeño porcentaje de células T (alrededor del 5% del total de células T) expresa un TCR que consiste en un polipéptido γ y un polipéptido δ. Las células T γδ se encuentran en su más alta abundancia en la mucosa intestinal, dentro de una población de linfocitos conocida como linfocitos intraepiteliales (IELs). Las moléculas antigenéricas que activan las células T γδ siguen siendo ampliamente desconocidas. Sin embargo, las células T γδ no están restringidas al MHC y parecen ser capaces de reconocer proteínas completas en lugar de requerir que los péptidos sean presentados por moléculas del MHC en las células presentadoras del antígeno, aunque algunas reconocen moléculas del MHC de clase IB. Las células T Vγ9/Vδ2 humanas, que constituyen la principal población de células T γδ en la sangre periférica, son únicas en el sentido de que responden específica y rápidamente a un pequeño metabolito microbiano no peptídico, HMB-PP, un precursor del isopentenil pirofosfato. Las estimaciones de los porcentajes de células T que se pueden encontrar en la sangre periférica de donadores sanos son las siguientes: CD3+=70.78%±4.71;

CD3+CD4+=38.97%±5.66; CD3+CD8+=28.955%±7.43; CD3+CD56+=5.22%±1.74; CD3-CD56+=10.305%±4.7; CD3+CD45RA+=45.00%±7.19; y CD3+CD45RO+=27.21%±7.34.

Las cadenas del receptor del antígeno de células T de un clon de células T se componen cada una de una combinación única de dominios designados variable (V), [diversidad (D),] unión (J) y constante (C). En cada 5 clon de células T, la combinación de los dominios V, D y J de las cadenas alfa y beta o de las cadenas delta y gamma participa en el reconocimiento del antígeno de una manera que es característicamente única de ese clon de células T y define un sitio de unión único, también conocido como el idiotipo del clon de células T. En cambio, el dominio C no participa en la unión al antígeno.

Un TCR es una proteína heterodimérica de superficie celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que 10 se asocia con proteínas invariantes del complejo CD3 implicadas en la mediación de la transducción de señales. Los TCRs existen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que son estructuralmente similares, pero que tienen localizaciones anatómicas y probablemente funciones muy distintas. La porción extracelular de los $\alpha\beta$ TCR y $\gamma\delta$ TCR heterodiméricos nativos contiene cada una dos polipéptidos, cada uno de los cuales tiene un dominio constante y 15 variable incluye un enlace disulfuro intracadena. Los dominios variables contienen los bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de los anticuerpos. El uso de la terapia génica del TCR supera una serie de obstáculos actuales. Permite dotar a las células T de los propios pacientes con las especificidades deseadas y generar números suficientes de células T en un corto 20 periodo de tiempo, evitando su agotamiento. El TCR se transducirá en células T potentes (por ejemplo, células T de memoria central o células T con características de células madre), lo que puede garantizar una mejor persistencia y funcionamiento tras la transferencia. Las células T diseñadas con TCR se infundirán en pacientes con cáncer linfopénicos mediante quimioterapia o irradiación, lo que permitirá un injerto eficiente, pero inhibirá la inmunosupresión.

Aunque se han realizado avances en el desarrollo de fármacos dirigidos a moléculas para la terapia contra el 25 cáncer, sigue existiendo una necesidad en la técnica de desarrollar nuevos agentes anticancerígenos que se dirijan específicamente a moléculas altamente específicas de las células cancerígenas. La presente descripción aborda esa necesidad proporcionando nuevos TCRs PRAME, respectivas construcciones recombinantes de TCR, ácidos nucleicos, vectores y células hospederas que se unen específicamente al epítope(s) del TAA como se divulga; y métodos de uso de dichas moléculas en el tratamiento del cáncer. El término TAA en el contexto 30 de la invención se refiere en particular a las siguientes proteínas preferibles: PRAME, y fragmentos o análogos del mismo, en particular fragmentos o análogos que comprenden o consisten en las secuencias peptídicas antigenéticas mostradas en SEQ ID NO: 97 a 115, preferiblemente SEQ ID NO: 97 a 106, más preferiblemente SEQ ID NO: 97.

El objetivo de la invención se resuelve en un primer aspecto mediante una construcción de reconocimiento del 35 antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) 3 que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferiblemente 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 129, y 135.

En algunas realizaciones, la construcción de reconocimiento del antígeno de la invención se une 40 específicamente a un complejo péptido TAA-molécula HLA, en el que el péptido TAA comprende, o alternativamente consiste en, una variante del TAA que es al menos 66%, preferiblemente al menos 77%, y más preferiblemente al menos 88% homóloga (preferiblemente al menos 77% o al menos 88% idéntica) a la secuencia de aminoácidos del TAA de la invención, en el que dicha variante se une a una molécula HLA de clase I o de clase II y/o induce células T que reaccionan de forma cruzada con dicho péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que dicho péptido no es el polipéptido de longitud completa 45 subyacente.

Tal como se utilizan en la presente, los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", cuando se utilizan en cualquier parte en la presente en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o proteína/polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen (o tienen al menos) un 50 porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, con, o al menos, alrededor de 60% de identidad, preferiblemente con, o al menos, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93% o 94% de identidad, y más preferiblemente con, o al menos, alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad sobre una región específica, preferiblemente sobre sus secuencias de longitud completa, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia en la ventana de comparación o región designada), medida utilizando algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Sitio web del NCBI). En una realización particular, por ejemplo cuando se compara la secuencia de proteína o ácido nucleico de una construcción de reconocimiento del antígeno de la invención con otra proteína/gen, el porcentaje de identidad puede determinarse mediante las búsquedas de Blast apoyadas en el sitio web del NCBI; en particular para la identidad de aminoácidos, aquellas que utilizan BLASTP con los siguientes parámetros: Umbral esperado 10; Tamaño de palabra: 6; Matriz: BLOSUM62;

Costes del hueco: Existencia: 11; Extensión: 1; Umbral de palabras vecinas: 11; Ajustes de composición: Ajuste condicional de la matriz de puntuación compositonal.

En el contexto de la presente invención se entenderá que cualquier realización a la que se refiera como "que comprende" ciertas características de la invención, se entenderá que incluye en algunas realizaciones más preferibles la descripción más restringida de "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" las mismas características de la presente invención.

En otra realización, la construcción de reconocimiento del antígeno puede comprender adicionalmente una CDR1 y/o una CDR2, o más preferiblemente una secuencia de dominio CDR2bis. Dentro del dominio variable, CDR1 y CDR2 o CDR2bis, se encuentran en la región variable (V) de una cadena polipeptídica, y CDR3 incluye parte de V, toda la diversidad (D) y las regiones de unión (J). La CDR3 es la más variable y es la principal CDR responsable del reconocimiento específico y selectivo de un antígeno. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR2bis se pueden seleccionar a partir de una secuencia CDR de un alelo de cadena variable de humano.

Los TCR heterodiméricos alfa-beta nativos tienen una cadena alfa y una cadena beta. Cada cadena comprende regiones variables, de unión y constantes, y la cadena beta también suele contener una región corta de diversidad entre las regiones variables y de unión, pero esta región de diversidad suele considerarse como parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDRs (Regiones Determinantes de la Complementariedad) incrustadas en una secuencia marco, siendo una de ellas la región hipervariante denominada CDR3. Existen diversos tipos de regiones variables de cadena alfa ($V\alpha$) y diversos tipos de regiones variables de cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su marco, las secuencias CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 parcialmente definida. Los tipos $V\alpha$ se denominan en la nomenclatura IMGT mediante un número TRAV único, los tipos $V\beta$ se denominan mediante un número TRBV único. Para mayor información sobre los genes de anticuerpos de inmunoglobulina y de TCR, véase el sistema internacional de información ImMunoGeneTics®, Lefranc M-P et al (Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43 (Database issue):D413-22; y <http://www.imgt.org/>).

Por lo tanto, en una realización, la construcción de reconocimiento del antígeno de la invención comprende secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 en una combinación como la proporcionada en la Tabla 1 en la presente a continuación, que muestra el alelo de cadena variable respectivo junto con la secuencia CDR3. Por lo tanto, se prefieren las construcciones de reconocimiento del antígeno de la invención que comprenden al menos una, preferiblemente, las cuatro secuencias CDR CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3. Preferiblemente, una construcción de reconocimiento del antígeno de la invención comprende las CDR1, CDR2bis y CDR3 respectivas de una región variable del TCR individual de la invención divulgada en la presente (véase la Tabla 1 de la presente a continuación y la sección de ejemplos).

El término "especificidad" o "especificidad del antígeno" o "específico para" un antígeno determinado, tal como se utiliza en la presente, significa que la construcción de reconocimiento del antígeno puede unirse específicamente a dicho antígeno, preferiblemente un antígeno del TAA, más preferiblemente con alta avidez, cuando dicho antígeno es presentado por HLA, preferiblemente por HLA A2. Por ejemplo, se puede considerar que un TCR como construcción de reconocimiento del antígeno tiene "especificidad antigénica" por el TAA, si las células T que expresan el TCR y entran en contacto con un HLA que presenta TAA secretan al menos alrededor de 200 pg/ml o más (por ejemplo, 250 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 700 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 2,000 pg/ml o más, 2,500 pg/ml o más, 5,000 pg/ml o más) de interferón γ (IFN-γ) tras el cocultivo con células diana pulsadas con una concentración baja de un antígeno del TAA, tal como los antígenos y epítopes del TAA proporcionados en la presente a continuación (por ejemplo, alrededor de 10-11 mol/l, 10-10 mol/l, 10-9 mol/l, 10-8 mol/l, 10-7 mol/l, 10-6 mol/l, 10-5 mol/l). Alternativa o adicionalmente, se puede considerar que un TCR tiene "especificidad antigénica" por el TAA, si las células T que expresan el TCR secretan al menos el doble de IFN-γ que el nivel de fondo no transducido de IFN-γ tras el cocultivo con células diana pulsadas con una concentración baja de los antígenos del TAA. Esta "especificidad" descrita anteriormente puede analizarse, por ejemplo, con un ELISA.

En una realización de la invención, la construcción de reconocimiento del antígeno se une selectivamente a un péptido antigénico derivado del TAA; preferiblemente, en el que el péptido antigénico del TAA es un epítope proteico o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:97, o una variante de la misma, en la que la variante es una delección, adición, inserción o sustitución de aminoácidos de no más de tres, preferiblemente dos y más preferiblemente no más de una posición de aminoácido.

El término "selectividad" o "unión/reconocimiento selectivo" se entiende que se refiere a la propiedad de una construcción de reconocimiento del antígeno, tal como un TCR o anticuerpo, de reconocer selectivamente o unirse preferiblemente a un solo epítope específico y preferiblemente no muestra ninguna o sustancialmente ninguna reactividad cruzada con otro epítope. Preferiblemente, "selectividad" o "unión/reconocimiento selectivo" significa que la construcción de reconocimiento del antígeno (por ejemplo, un TCR) reconoce selectivamente o se une preferiblemente a un solo epítope específico y preferiblemente no muestra ninguna o sustancialmente ninguna reactividad cruzada con otro epítope, en el que dicho epítope es único para una

proteína, de manera que la construcción de reconocimiento del antígeno no muestra ninguna o sustancialmente ninguna reactividad cruzada con otro epítope y otra proteína.

La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención se selecciona preferiblemente de un anticuerpo, o derivado o fragmento del mismo, o un receptor de células T (TCR), o derivado o fragmento del mismo. Un derivado o fragmento de un anticuerpo o TCR de la invención conservará preferiblemente la capacidad de unión/reconocimiento del antígeno de la molécula parental, en particular su especificidad y/o selectividad como se explicó anteriormente. Dicha funcionalidad de unión se puede conservar mediante la presencia de una región CDR3 como se define en la presente.

En una realización de la invención, los TCRs de la invención son capaces de reconocer antígenos del TAA en una manera dependiente del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. "De manera dependiente del MHC de clase I", tal como se utiliza en la presente, significa que el TCR provoca una respuesta inmune al unirse a los antígenos del TAA en el contexto de una molécula del MHC de clase I. La molécula del MHC de clase I puede ser cualquier molécula del MHC de clase I conocida en la técnica, por ejemplo, moléculas HLA-A. En una realización preferible de la invención, la molécula del MHC de clase I es una molécula HLA-A2.

La invención proporciona tanto construcciones que reconocen antígenos de cadena sencilla como construcciones que reconocen antígenos de cadena doble.

En una realización, el dominio variable alfa del TCR tiene al menos una mutación relativa a un dominio alfa del TCR mostrado en la Tabla 1; y/o el dominio variable beta del TCR tiene al menos una mutación relativa a un dominio alfa del TCR mostrado en la Tabla 1. En una realización, un TCR que comprende al menos una mutación en el dominio variable alfa del TCR y/o en el dominio variable beta del TCR tiene una afinidad de unión para, y/o una vida media de unión para, un complejo péptido TAA-molécula HLA, que es al menos el doble que la de un TCR que comprende el dominio alfa del TCR no mutado y/o el dominio variable beta del TCR no mutado.

Las cadenas del TCR alfa de la presente descripción pueden comprender adicionalmente un dominio transmembranal alfa del TCR y/o un dominio intracelular alfa del TCR. Las cadenas beta del TCR de la presente descripción pueden comprender adicionalmente un dominio transmembranal beta del TCR y/o un dominio intracelular beta del TCR.

La invención en particular proporciona un TCR como construcción de reconocimiento del antígeno, o fragmento o derivado de la misma. El TCR es preferiblemente de humano, entiéndese como que se genera a partir de un locus TCR humano y que, por tanto, comprende secuencias TCR de humano. Además, el TCR de la invención se puede caracterizar porque es de origen humano y reconoce específicamente un antígeno del TAA de la invención.

Otra realización de la invención proporciona la construcción de reconocimiento del antígeno descrita anteriormente, que induce una respuesta inmune, preferiblemente en la que la respuesta inmune se caracteriza por un aumento de los niveles de interferón (IFN) γ .

Los TCRs de la invención pueden proporcionarse como moléculas de cadena sencilla α o β , o γ y δ , o alternativamente como construcciones de cadena doble compuestas tanto de la cadena α como β , o de la cadena γ y δ .

La construcción de reconocimiento del antígeno de la invención puede comprender una cadena α o γ del TCR; y/o una cadena β o δ del TCR; en la que la cadena α o γ del TCR comprende una CDR3 que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 3 y/o en la que la cadena β o δ del TCR comprende una CDR3 que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 9.

Más preferiblemente, en algunas realizaciones adicionales, en las que la divulgación se refiere a construcciones de reconocimiento del antígeno que comprenden cualquiera de una, dos, tres o todas las regiones CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 de las cadenas TCR divulgadas en la presente (véase la Tabla 1), dichas construcciones de reconocimiento del antígeno pueden preferirse, las cuales comprenden la secuencia CDR respectiva de la invención con no más de tres, dos, y preferiblemente sólo un residuo de aminoácido modificado.

Un residuo de aminoácido modificado se puede seleccionar entre una inserción, delección o sustitución de aminoácido. Lo más preferible es que de los tres, dos, preferiblemente sólo un residuo de aminoácido modificado sea el primer o el último residuo de aminoácido de la secuencia CDR respectiva. Si la modificación es una sustitución, entonces es preferible en algunas realizaciones que la sustitución sea una sustitución conservadora de aminoácido.

Si la construcción de reconocimiento del antígeno de la invención se compone de al menos dos cadenas de aminoácidos, como un TCR de doble cadena, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, la construcción de reconocimiento del antígeno puede comprender en una primera cadena polipeptídica la secuencia de

aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3, y en una segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 9. Uno cualquiera de los TCR de doble cadena mencionados anteriormente, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, son TCR preferibles de la presente invención. En algunas realizaciones, la CDR3 del TCR de doble cadena de la invención puede estar mutada. Las 5 mutaciones de las secuencias CDR3 según lo dispuesto anteriormente incluyen preferiblemente una sustitución, supresión, adición o inserción de no más de tres, preferiblemente dos, y más preferiblemente no más de un residuo de aminoácido. En algunas realizaciones, la primera cadena polipeptídica puede ser una cadena α o γ del TCR, y la segunda cadena polipeptídica puede ser una cadena β o δ del TCR. Es preferible la combinación de un TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

10 En algunas realizaciones, el TCR, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, está compuesto por una cadena α del TCR y una β del TCR, o una cadena γ y δ . Dicho TCR de doble cadena comprende dentro de cada cadena regiones variables, y las regiones variables comprenden cada una, una secuencia CDR1, una CDR2, o más preferiblemente una CDR2bis, y una CDR3. Los TCRs comprenden las secuencias CDR1, CDR2, 15 CDR2bis y CDR3 como están comprendidas en la secuencia de aminoácidos de cadena variable de SEQ ID NOs: 4 y 10; o 130 y 136.

20 Algunas realizaciones de la invención pertenecen a un TCR, o un fragmento del mismo, compuesto por una cadena α del TCR y una β del TCR, en el que dicho TCR comprende las secuencias de región variable que tienen al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferiblemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada de la cadena α y β de acuerdo con SEQ ID NOs: 4 y 10; o 130 y 136.

25 En una realización particularmente preferible, la presente invención proporciona un TCR mejorado, designado como R11P3D3_KE, compuesto de una cadena α del TCR y una β del TCR, en el que dicho TCR comprende las secuencias de región variable que tienen al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferiblemente 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada de la cadena α y β de acuerdo con SEQ ID NOs: 132 y 138. Este TCR mostró una funcionalidad sorprendentemente mejorada 30 en términos de reconocimiento de células tumorales cuando se compara con su receptor parental, designado en la presente como R11P3D3.

35 Los TCRs de la invención pueden comprender adicionalmente una región constante derivada de cualquier especie adecuada, tal y como cualquier mamífero, por ejemplo, humano, rata, mono, conejo, burro o ratón. En una realización de la invención, los TCRs de la invención comprenden adicionalmente una región constante humana. En algunas realizaciones preferibles, la región constante del TCR de la invención se puede modificar ligeramente, por ejemplo, mediante la introducción de secuencias heterólogas, preferiblemente secuencias de ratón, que pueden aumentar la expresión y estabilidad del TCR. En algunas realizaciones preferibles, la región variable del TCR de la intervención se puede modificar ligeramente, por ejemplo, mediante la introducción de 40 mutaciones puntuales únicas para optimizar la estabilidad del TCR y/o mejorar el emparejamiento de cadenas del TCR.

Algunas realizaciones de la invención se refieren a un TCR, o un fragmento del mismo, compuesto de una cadena α del TCR y una β del TCR, en el que dicho TCR comprende la región constante que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferiblemente 100% de identidad de secuencia con una 45 secuencia de aminoácidos seleccionada de la cadena α y β de acuerdo con SEQ ID NOs: 5 y 11; o 131 y 137.

La cadena α o γ del TCR de la invención puede comprender adicionalmente una CDR1 que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 1; y/o una CDR2 que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ 50 ID Nos. 2; y/o más preferiblemente una CDR2bis que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 196, 197, 198, 199, 200.

De acuerdo con la invención, la cadena β o δ del TCR puede comprender adicionalmente una CDR1 que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 7; y/o una CDR2 que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 8; y/o más preferiblemente una CDR2bis que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 8 y 134.

55 En otra realización adicional, la construcción de reconocimiento del antígeno puede comprender un fragmento de unión de un TCR, y en el que dicho fragmento de unión comprende en una cadena CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3, seleccionadas opcionalmente de las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 196; o 7, 8, 9.

En realizaciones adicionales de la invención, la construcción de reconocimiento del antígeno descrita en otra parte de la presente es un TCR, o un fragmento del mismo, compuesto de al menos una secuencia de cadena α del TCR y una β del TCR, en la que dicha secuencia de cadena α del TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 3 y 196, y dicha secuencia de cadena β del TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 a 9.

En realizaciones adicionales de la invención, la construcción de reconocimiento del antígeno descrita anteriormente en la presente es un TCR, o un fragmento del mismo, que comprende al menos una cadena α del TCR y una β del TCR, en la que dicha secuencia de cadena α del TCR comprende una secuencia de región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4, y en la que dicha secuencia de cadena β del TCR comprende una secuencia de región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 10; o en la que dicha secuencia de cadena α del TCR comprende una secuencia de región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 130, y en la que dicha secuencia de cadena β del TCR comprende una secuencia de región variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 136.

En realizaciones adicionales de la invención, la construcción de reconocimiento del antígeno descrita anteriormente en la presente es un TCR, o un fragmento del mismo, que comprende adicionalmente una región constante del TCR que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 5, 11, 131, y 137 preferiblemente en la que el TCR está compuesto de al menos una secuencia de una cadena α del TCR y una β del TCR, en la que la secuencia de cadena α del TCR comprende una región constante que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 5 y 131; y en la que la secuencia de cadena β del TCR comprende una región constante que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nos. 11 y 137.

También se divultan construcciones de reconocimiento del antígeno como las descritas anteriormente en la presente que comprenden una primera cadena del TCR que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 6, y una segunda cadena del TCR que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 12. En realizaciones adicionales, la invención proporciona construcciones de reconocimiento del antígeno que son TCR y comprenden una primera cadena del TCR que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 132, y una segunda cadena del TCR que tiene al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 138.

Como se utiliza en la presente, el término "murino" o "humano", cuando se refiere a una construcción de reconocimiento del antígeno, o un TCR, o cualquier componente de un TCR descrito en la presente (por ejemplo, región determinante de la complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena α, y/o cadena β), significa un TCR (o componente del mismo), que se deriva de un locus del TCR de ratón o humano no reordenado, respectivamente.

En una realización de la invención, se proporcionan TCR químéricos, en los que las cadenas del TCR comprenden secuencias de múltiples especies. Preferiblemente, un TCR de la invención puede comprender una cadena α que comprende una región variable humana de una cadena α y, por ejemplo, una región constante murina de una cadena α del TCR murino.

En una realización, el TCR de la invención es un TCR humano que comprende regiones variables de humano de acuerdo con las realizaciones anteriores y regiones constantes de humano.

En algunas realizaciones, la construcción de reconocimiento del antígeno está murinizada o humanizada. Estos términos se utilizan cuando se introducen secuencias de aminoácidos de una especie extraña en una construcción de la invención.

El TCR de la invención se puede proporcionar como un TCR de cadena sencilla (scTCR). Un scTCR de acuerdo con la invención comprenderá en una cadena polipeptídica una secuencia de cadena alfa completa o parcial y una secuencia de cadena beta completa o parcial, preferiblemente conectadas mediante un enlazador peptídico. Un scTCR puede comprender un polipéptido de una región variable de una primera cadena del TCR (por ejemplo, una cadena alfa) y un polipéptido de una segunda cadena del TCR completa (longitud completa) (por ejemplo, una cadena beta), o viceversa. Además, el scTCR puede comprender opcionalmente uno o más enlazadores que unan a los dos o más polipéptidos. El enlazador puede ser, por ejemplo, un péptido, que une a dos cadenas sencillas, como se describe en la presente. También se proporciona un scTCR de la invención, que está fusionado a una citocina humana, tal como IL-2, IL-7 o IL-15.

La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención también se puede proporcionar en forma de un complejo multimérico, que comprende al menos dos moléculas scTCR, en el que dichas moléculas scTCR están fusionadas cada una con al menos una fracción de biotina, u otra molécula/enlazador de interconexión, y en el que dichas scTCRs están interconectadas por interacción de biotina estreptavidina para permitir la formación de dicho complejo multimérico. Aproximaciones similares conocidas en la técnica para la generación de TCR multiméricos también son posibles y se incluyen en esta divulgación. También se proporcionan complejos multiméricos de un orden superior, que comprenden más de dos scTCR de la invención.

Para los propósitos de la presente invención, un TCR es una fracción que tiene al menos un dominio variable alfa o gamma del TCR y/o beta o delta del TCR. Generalmente, comprenden tanto un dominio variable alfa del TCR como un dominio variable beta del TCR, alternativamente tanto un dominio variable gamma del TCR como un dominio variable delta del TCR. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta/\gamma\delta$ o estar en formato de cadena sencilla. Para uso en terapia adoptiva, un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ puede, por ejemplo, transfectarse como cadenas de longitud completa que tienen dominios tanto citoplasmáticos como transmembranales. Si se desea, puede estar presente un enlace disulfuro introducido entre los residuos de los respectivos dominios constantes.

En una realización preferible, la construcción de reconocimiento del antígeno es un TCR de humano, o fragmento o derivado del mismo. Un TCR humano o un fragmento o derivado del mismo es un TCR que comprende más del 50% de la secuencia del TCR humano correspondiente. Preferiblemente, sólo una pequeña parte de la secuencia del TCR es de origen artificial o derivada de otras especies. Se sabe, sin embargo, que los TCR químicos, por ejemplo, derivados de origen humano con secuencias murinas en los dominios constantes, son ventajosos. Particularmente preferibles son, por tanto, los TCRs de acuerdo con la presente invención, que contienen secuencias murinas en la parte extracelular de sus dominios constantes.

Por lo tanto, también se prefiere que la construcción de reconocimiento del antígeno de la invención sea capaz de reconocer su antígeno de una manera dependiente del antígeno leucocitario humano (HLA), preferiblemente de una manera dependiente del HLA-A*02. El término "manera dependiente del HLA" en el contexto de la presente invención significa que la construcción de reconocimiento del antígeno se une al antígeno sólo en el caso de que el péptido antigenóico sea presentado por dicho HLA.

La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención en una realización induce preferiblemente una respuesta inmune, preferiblemente en la que la respuesta inmune se caracteriza por el aumento de los niveles del interferón (IFN) γ .

También, proporcionado por la invención es un polipéptido que comprende una porción funcional de cualquiera de los TCRs (o variantes funcionales de los mismos) descritos en la presente, por ejemplo, de uno cualquiera de los TCRs seleccionados de R11P3D3 y R11P3D3_KE, como se proporciona en la sección de ejemplos y la Tabla 1. El término "polipéptido", tal como se utiliza en la presente incluye oligopéptidos y se refiere a una cadena sencilla de aminoácidos conectados por uno o más enlaces peptídicos. Con respecto a los polipéptidos de la invención, la porción funcional puede ser cualquier porción que comprenda aminoácidos contiguos del TCR (o variante funcional del mismo), del que forma parte, siempre que la porción funcional se une específicamente al antígeno del TAA, preferiblemente como se divulga en la presente en la Tabla 2, y los péptidos A1 a A9 (SEQ ID NOs:97, y 98-106, y los péptidos T1 a T9 (SEQ ID NOs:107-115)). El término "porción funcional" cuando se utiliza en referencia a un TCR (o variante funcional del mismo) se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR (o variante funcional del mismo) de la invención, cuya parte o fragmento retiene la actividad biológica del TCR (o variante funcional del mismo), del que forma parte (el TCR parental o variante funcional parental del mismo). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR (o variante funcional del mismo) que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno del TAA (de forma dependiente del HLA), o de detectar, tratar o prevenir el cáncer, en un grado similar, un grado igual o un grado superior al del TCR parental (o variante funcional del mismo). En referencia al TCR parental (o variante funcional del mismo), la porción funcional puede comprender, por ejemplo, alrededor del 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, o más, de las secuencias variables del TCR parental (o variante funcional del mismo).

La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo de la porción, o en ambos extremos, en los que los aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del TCR parental o de la variante funcional del mismo. De forma deseable, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, unirse específicamente a los antígenos del TAA; y/o tener la capacidad de detectar cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del TCR parental o la variante funcional del mismo.

El polipéptido puede comprender una porción funcional de una o ambas cadenas α y β de los TCRs o la variante funcional de los mismos de la invención, tal como una porción funcional que comprende una o más de CDR1, CDR2, CDR2bis y (preferiblemente) CDR3 de la(s) región(es) variable(s) de la cadena α y/o cadena β de un TCR o variante funcional del mismo de la invención. En una realización de la invención, el polipéptido puede comprender una porción funcional que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 9 (CDR3

de las regiones variables del TCR de la invención), o una combinación de los mismos. En una realización de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR de la invención o una variante funcional del mismo que comprende una combinación de las regiones CDR expuestas anteriormente. En este respecto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 4, 10, 130 y 136 (las regiones variables de una cadena α o β del TCR de la invención).

En algunos casos, la construcción de la invención puede comprender una o dos cadenas polipeptídicas que comprenden una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 12 y 130-132, 136 a 138 y 196 (secuencias CDR, regiones constantes y variables y secuencias de longitud completa), o fragmentos funcionales de las mismas, y adicionalmente comprende(n) 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. En 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, que se expresa en marco (en tandem) con uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente. El otro polipéptido puede incluir cualquier molécula peptídica o proteínica, o una porción de la misma, incluyendo, pero sin limitarse a una inmunoglobulina, CD3, 10 CD4, CD8, una molécula del MHC, una molécula CD1, por ejemplo, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

La proteína de fusión puede comprender una o más copias del polipéptido de la invención y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, o más, copias del polipéptido de la invención y/o del otro polipéptido. Los métodos adecuados para fabricar proteínas de fusión son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, métodos recombinantes. En algunas realizaciones de la invención, los TCRs (y porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos y proteínas de la invención pueden expresarse como una sola proteína que comprende un péptido enlazador que une la cadena α y la cadena β, y que une la cadena γ y la cadena δ. En este respecto, los TCRs (y variantes funcionales y porciones funcionales de los mismos), polipéptidos y proteínas de la invención que comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del TCR de la invención y pueden comprender adicionalmente un péptido enlazador. El péptido enlazador puede facilitar ventajosamente la expresión de un TCR recombinante (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), polipéptido y/o proteína en una célula hospedera. El péptido enlazador puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. Las secuencias enlazadoras para construcciones del TCR de cadena sencilla son bien conocidas en la técnica. Dicha construcción de cadena sencilla puede comprender adicionalmente una, o dos, secuencias de dominio constante. Tras la expresión de la construcción que incluye el péptido enlazador por una célula hospedera, el péptido enlazador también puede escindirse, dando lugar a cadenas α y β separadas, y a cadenas γ y δ separadas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la funcionalidad de unión del TCR de la invención se puede proporcionar en el marco de un anticuerpo. Por ejemplo, las secuencias CDR del TCR de la invención, posiblemente incluyen 3, 2 o 1 residuos marco N y/o C terminales adicionales, se pueden insertar directamente en una secuencia de cadena pesada/ligera variable del anticuerpo. El término "anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales se utiliza en la presente para referirse a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno o un parátopo. Dichas moléculas también se denominan como "fragmentos de unión al antígeno" de las moléculas de inmunoglobulina. La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a los antígenos descritos en la presente. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina conocida en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo diseñado genéticamente, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo químico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica.

El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, formas de inmunoglobulinas diseñadas genéticamente o modificadas de otra forma, tal como intracuerpos, anticuerpos químicos, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados (por ejemplo, generados por "injerto de CDR"), fragmentos de anticuerpos y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, tricuerpos, tetra cuerpitos, etc.). El término "anticuerpo" incluye cis diacuerpos y minicuerpos. Por lo tanto, todas y cada una de las realizaciones proporcionadas en la presente con respecto a "anticuerpos" o "construcciones similares a anticuerpos" también se consideran como realizaciones de anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, fragmentos scFv, construcciones de receptores de anticuerpos químicos (CAR), diacuerpo y/o minicuerpo, a menos que se indique explícitamente lo contrario. El término "anticuerpo" incluye un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas o un polipéptido que comprende fragmentos de una inmunoglobulina que es capaz de unirse de forma no covalente, reversible y específica a un antígeno correspondiente, preferiblemente el TAA de la invención, como se divulga en la presente. Una unidad estructural de anticuerpo ejemplar comprende un tetrámero. En algunas realizaciones, un anticuerpo de longitud completa puede estar compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" y una "pesada" (conectadas

mediante un enlace disulfuro). La estructura y los isotipos de los anticuerpos son bien conocidos por el experto en la técnica (por ejemplo, de Janeway's Immunobiology, 9th edition, 2016).

- Los genes de inmunoglobulina reconocidos de mamíferos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina (para más información sobre los genes de inmunoglobulina véase el sistema de información internacional Im-MunoGeneTics®, Lefranc M-P et al, Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D413-22, y <http://www.imgt.org/>). En el caso de las cadenas de longitud completa, las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Para las cadenas de longitud completa, las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. El N terminal de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 aminoácidos o más, responsable principalmente por el reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas regiones de las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Tal como se utiliza en esta invención, un "anticuerpo" engloba todas las variaciones de anticuerpos y fragmentos de los mismos. Por lo tanto, dentro del alcance de este concepto se encuentran los anticuerpos de longitud completa, anticuerpos químéricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), Fab, Fab' y versiones multiméricas de estos fragmentos (por ejemplo, F(ab')2) con la misma, esencialmente la misma o similar especificidad de unión. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un péptido TAA de la invención. Las construcciones preferibles de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención incluyen una cadena pesada del anticuerpo, preferiblemente el dominio variable de la misma, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, y/o una cadena ligera del anticuerpo, preferiblemente el dominio variable de la misma, o un fragmento de unión al antígeno de la misma. De forma similar, se pueden preparar fragmentos de región variable estabilizados con disulfuro (dsFv) mediante tecnología de ADN recombinante, los fragmentos de anticuerpos de la invención, sin embargo, no se limitan a estos tipos ejemplares de fragmentos de anticuerpos. Asimismo, el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, se puede modificar para incluir una etiqueta detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isoftiocianato de fluoresceína (FITC) ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro). En algunos casos, la secuencia CDR3 del TCR puede estar ligeramente modificada, pero preferiblemente en no más de 3 residuos de aminoácidos, preferiblemente sólo dos, y más preferiblemente sólo una posición de aminoácido, en comparación con las secuencias CDR3 proporcionadas en SEQ ID Nos: 3 y 9. Preferiblemente, los anticuerpos comprenden la CDR3, preferiblemente todas las regiones CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 en la combinación, como se indica para el TCR de la invención en la Tabla 1, en cada caso independientemente, opcionalmente con no más de tres o dos, preferiblemente una sustitución(es), inserción(es) y/o delección(es) de aminoácidos en comparación con estas secuencias.
- Los métodos adecuados para fabricar anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos estándar de hibridoma se describen en, por ejemplo, Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 8 Ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2011). Alternativamente, otros métodos, como los métodos de hibridoma del EBV (Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), y Roder et al, Methods Enzymol, 121, 140-67 (1986)), y sistemas de expresión de vectores bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)) son conocidos en la técnica. Además, los métodos de producción de anticuerpos en animales no humanos se describen en, por ejemplo, Patentes de EE.UU. 5,545,806, 5,569,825 y 5,714,352 y Publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2002/0197266.
- Algunas realizaciones de la invención también pertenecen a los TCRs, o fragmentos funcionales y polipéptidos de los mismos, que son TCRs solubles. Como se utiliza en la presente, el término "receptor soluble de células T" se refiere a variantes truncadas heterodiméricas de los TCRs nativos, que comprenden porciones extracelulares de la cadena α y la cadena β del TCR, por ejemplo, unidas por un enlace disulfuro, pero que carecen de los dominios transmembranales y citosólicos de la proteína nativa. Los términos "secuencia de cadena α del receptor de células T soluble" y "secuencia de cadena β del receptor de células T soluble" se refieren a las secuencias de la cadena α y cadena β del TCR que carecen de los dominios transmembranales y citosólicos. La secuencia (aminoácido o ácido nucleico) de las cadenas α y β del TCR soluble puede ser idéntica a las secuencias correspondientes en un TCR nativo o puede comprender secuencias variantes de las cadenas α y β del TCR soluble, en comparación con las secuencias correspondientes del TCR nativo. El término "receptor soluble de células T", como se utiliza en la presente, abarca los TCRs solubles con secuencias variantes o no variantes de cadena α y cadena β del TCR soluble. Las variaciones pueden estar en las regiones variables o constantes de las secuencias de las cadenas α y β del TCR soluble y pueden incluir, pero no se limitan a, mutaciones de delección, inserción y sustitución de aminoácidos, así como cambios a la secuencia del ácido nucleico que no alteran la secuencia de aminoácidos. El TCR soluble de la invención conserva en cualquier caso la funcionalidad de unión de sus moléculas parentales.
- El problema anterior se resuelve adicionalmente mediante un ácido nucleico que codifica para una construcción de reconocimiento del antígeno de la invención, o cualquiera de las construcciones de proteína o polipéptido antes mencionados. El ácido nucleico preferiblemente (a) tiene una hebra que codifica para una construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención; (b) tiene una hebra complementaria a la hebra en

(a); o (c) tiene una hebra que hibrida bajo condiciones estrictas con una molécula como se describió en (a) o (b). Las condiciones estrictas son conocidas para la persona experta en la técnica, concretamente de Sambrook et al, "Molecular Cloning". Además de esto, el ácido nucleico tiene opcionalmente secuencias adicionales, que son necesarias para expresar la secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína, específicamente para la expresión en una célula de mamífero/humano. El ácido nucleico utilizado puede estar contenido en un vector adecuado para permitir la expresión de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al péptido en una célula. Sin embargo, los ácidos nucleicos también se pueden utilizar para transformar una célula presentadora del antígeno, que puede no estar limitado a las células presentadoras del antígeno clásicas, como las células dendríticas, de manera que ellas mismas produzcan las proteínas correspondientes en su superficie celular.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de las construcciones de reconocimiento del antígeno pueden codificarse mediante ácidos nucleicos y expresarse *in vivo* o *in vitro*. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica para una construcción de reconocimiento del antígeno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica para una parte o un monómero de una construcción de reconocimiento del antígeno de la invención (por ejemplo, una de dos cadenas de un TCR de la invención), y/u otro ácido nucleico que codifica para otra parte o monómero de una construcción de reconocimiento del antígeno de la invención (por ejemplo, la otra de dos cadenas del TCR). En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica para dos o más antígenos que reconocen cadenas polipeptídicas de la construcción, por ejemplo, al menos 2 cadenas del TCR. Los ácidos nucleicos que codifican para múltiples cadenas de la construcción de reconocimiento del antígeno pueden incluir sitios de escisión de ácido nucleico entre al menos dos secuencias de la cadena, pueden codificar para sitios de inicio de la transcripción o traducción entre dos o más secuencias de la cadena, y/o pueden codificar para sitios diana proteolíticos entre dos o más cadenas de la construcción que reconocen al antígeno.

"Ácido nucleico", tal como se utiliza en la presente, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y puede contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosforoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster que se encuentra entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado.

30 Preferiblemente, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. Tal como se utiliza en la presente, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas mediante la unión de segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que se pueden replicar en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de las descritas en (i) anteriormente. Para los propósitos de la presente, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*. El ácido nucleico 35 puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique para cualquiera de los TCRs, polipéptidos o proteínas, o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos descritos en la presente.

Además, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención como se describe anteriormente. Deseablemente, el vector es un vector de expresión o un vector de expresión recombinante. El término "vector de expresión recombinante" se refiere en el contexto de la presente invención 40 a una construcción de ácido nucleico que permite la expresión de un ARNm, proteína o polipéptido en una célula hospedera adecuada. El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y se puede utilizar para transformar o transfectar cualquier hospedero adecuado. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas, como los plásmidos y los virus. Los ejemplos de vectores de expresión animal incluyen pEUK-Cl, pMAM y pMAMneo. Preferiblemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral. El vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción, que son específicos del tipo de célula hospedera (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal), en la que se va a introducir el vector y en la que se puede llevar a cabo la expresión del ácido nucleico de la invención. Además, el vector de la invención 45 puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de hospederos transformados o transfectados. El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica para las construcciones de la invención, o a la secuencia de nucleótidos, que es complementaria a, o que hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica para las construcciones de la invención. La selección de promotores incluye, por ejemplo, promotores fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos del desarrollo. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral. Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden diseñar ya sea 50 para la expresión transitoria, para la expresión estable o para ambas. Asimismo, los vectores de expresión recombinantes pueden fabricarse para la expresión constitutiva o para la expresión inducible.

La invención también se refiere a una célula hospedera que comprende una construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención. Específicamente, la célula hospedera de la invención comprende un ácido nucleico, o un vector como se describió anteriormente en la presente. La célula hospedera puede ser una célula eucariota, por ejemplo, vegetal, animal, fungi o alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo,

- bacteria o protozoo. La célula hospedera puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un humano. La célula hospedera puede ser una célula adherente o una célula en suspensión, es decir, una célula que crece en suspensión. Para el propósito de producir un TCR, polipéptido o proteína recombinante, la célula hospedera es preferiblemente una célula de mamífero. Lo más preferiblemente, la célula hospedera es una célula humana. Aunque la célula hospedera puede ser de cualquier tipo celular, puede proceder de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier estadio del desarrollo, la célula hospedera es preferiblemente un leucocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). Más preferiblemente, la célula hospedera es una célula T. 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, preferiblemente una célula T o un precursor de célula T de un paciente humano. Si se obtienen de un mamífero, la célula T se puede obtener de diversas fuentes, incluyendo, pero no limitado a la sangre, la médula ósea, los ganglios linfáticos, el timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden enriquecer o purificar. Preferiblemente, la célula T es una célula T humana. Más preferiblemente, la célula T es una célula T aislada de un humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T y puede ser de cualquier estadio del desarrollo, incluyendo, pero sin limitarse a, células T auxiliares CD4 positivas y/o CD8 positivas, por ejemplo, células Th1 y Th2, células T CD8 positivas (por ejemplo, células T citotóxicas), células infiltrantes de tumores (TILs), células T de memoria, células T ingenuas, y similares. Preferiblemente, la célula T es una célula T CD8 positiva o una célula T CD4 positiva.
- Preferiblemente, la célula hospedera de la invención es un linfocito, preferiblemente, un linfocito T, tal como una célula T CD4 positiva o CD8 positiva. Además, la célula hospedera es preferiblemente una célula T reactiva tumoral específica para las células tumorales que expresan TAA.
- El objetivo de la invención también se resuelve mediante un método de fabricación de una construcción de reconocimiento del antígeno específico del TAA, o de una línea celular que expresa una construcción de reconocimiento del antígeno específico del TAA, que comprende
- Proporcionar una célula hospedera adecuada,
 - Proporcionar una construcción genética que comprenda una secuencia codificante que codifique para una construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención divulgada en la presente,
 - Introducir en dicha célula hospedera adecuada dicha construcción genética, y
 - Expresar dicha construcción genética mediante dicha célula hospedera adecuada.
- El método puede comprender adicionalmente un paso de presentación en la superficie celular de dicha construcción de reconocimiento del antígeno en dicha célula hospedera adecuada.
- En otras realizaciones preferibles, la construcción genética es una construcción de expresión que comprende una secuencia promotora unida operativamente a dicha secuencia codificante. Preferiblemente, dicha construcción de reconocimiento del antígeno es de origen de mamífero, preferiblemente de origen humano. La célula hospedera adecuada preferible para uso en el método de la invención es una célula de mamífero, tal como una célula humana, en particular un linfocito T humano. Las células T para uso en la invención se describen con detalle en la presente anteriormente.
- También se incluyen en la invención las realizaciones en las que dicha construcción de reconocimiento del antígeno es un TCR modificado, en el que dicha modificación es la adición de dominios funcionales, tales como una etiqueta o una sustancia terapéuticamente activa. Además, se incluyen los TCR que tienen dominios alternativos, tal como un dominio de anclaje a la membrana alternativo en lugar de la región transmembranal endógena. También se incluyen los TCR que tienen mutaciones puntuales en el dominio variable o el dominio constante del TCR para mejorar la expresión o la estabilidad del TCR y/o el emparejamiento de las cadenas.
- Deseablemente, el sistema de transfección para introducir la construcción genética en dicha célula hospedera adecuada es un sistema de vector retroviral. Tales sistemas son bien conocidos por el experto en la técnica.
- Además, la presente invención comprende en una realización el paso adicional del método de aislamiento y purificación de la construcción de reconocimiento del antígeno a partir de la célula y, opcionalmente, la reconstitución de los fragmentos de construcción de reconocimiento del antígeno traducidos en una célula T.
- En un aspecto alternativo de la invención se proporciona una célula T obtenida u obtenible por un método para la producción de un receptor de células T (TCR), que es específico para células tumorales y tiene alta avidez como se describe anteriormente en la presente. Dicha célula T depende de la célula hospedera utilizada en el método de la invención, por ejemplo, una célula T humana o no humana, preferiblemente un TCR de humano.
- El término "aislado", tal como se utiliza en la presente en el contexto de un polipéptido, tal como una construcción de reconocimiento del antígeno (un ejemplo de la cual podría ser un anticuerpo), se refiere a un

polipéptido que se purifica a partir de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación o de otro tipo. Una construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención puede ser una construcción de unión al antígeno recombinante, sintética o modificada (no natural). El término "aislado", tal como se utiliza en la presente en el contexto de un ácido nucleico o células, se refiere a un ácido nucleico o células que se purifican de ADN, ARN, proteínas o polipéptidos u otros contaminantes (tal como otras células) que podrían interferir con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación o de otro tipo, o se refiere a un ácido nucleico recombinante, sintético o modificado (no natural). En este contexto, una proteína/polipéptido o ácido nucleico "recombinante" es aquel fabricado utilizando técnicas recombinantes. Los métodos y técnicas para la producción de ácidos nucleicos y 10 proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a las construcciones de reconocimiento del antígeno, ácidos nucleicos, vectores, composiciones farmacéuticas y/o células hospederas divulgadas en la presente para uso en medicina. El uso en medicina en una realización preferible incluye el uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad tumoral, tal como una enfermedad tumoral maligna o benigna. 15 La enfermedad tumoral es, por ejemplo, una enfermedad tumoral caracterizada por la expresión del TAA, en un cáncer o una célula tumoral de dicha enfermedad tumoral.

Con respecto a las aplicaciones médicas antes mencionadas de las construcciones de reconocimiento del antígeno y otros materiales derivados de las mismas, pertenecientes a la misma o codificando a la misma, de acuerdo con la presente divulgación, las enfermedades a tratar y/o a diagnosticar pueden ser cualquier trastorno proliferativo, preferiblemente caracterizado por la expresión de la secuencia del TAA o epítope del TAA de la invención, por ejemplo cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrecto, cáncer de ojo, cáncer de conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal, u oído medio, cáncer de la cavidad 20 oral, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer del pene, cáncer del páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, 25 cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer del recto, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de la uretra y cáncer de vejiga urinaria. Un cáncer preferible es cáncer de cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva o pene. Un cáncer particularmente preferible es un cáncer 30 positivo para TAA, incluyendo preferiblemente el carcinoma de ovario, la leucemia o el melanoma.

35 Las construcciones, proteínas, anticuerpos del TCRs, polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención son en particular para uso en terapia inmunológica, preferiblemente, en terapia de células T adoptiva. La administración de los compuestos de la invención puede, por ejemplo, implicar la infusión de células T de la invención en dicho paciente. Preferiblemente, dichas células T son células T autólogas del paciente y transducidas *in vitro* con un ácido nucleico o construcción de reconocimiento del antígeno de la presente invención.

40 Las construcciones de reconocimiento del antígeno de la invención, TCRs, polipéptidos, proteínas (incluyendo variantes funcionales de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospederas (incluyendo poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluyendo porciones de unión al antígeno de los mismos), todos los cuales se denominan colectivamente en lo sucesivo como "materiales TCR de la invención", se pueden formular en una composición, tal como una composición farmacéutica. En este respecto, 45 la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las construcciones de reconocimiento del antígeno, TCRs, polipéptidos, proteínas, porciones funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células hospederas (incluyendo poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluyendo porciones de unión al antígeno de los mismos) descritos en la presente, y un portador, excipiente y/o estabilizador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención 50 que contienen cualquiera de los materiales del TCR de la invención pueden comprender más de un material del TCR de la invención, por ejemplo, un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más TCRs diferentes (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material del TCR de la invención en combinación con otro(s) fármaco(s) o 55 agente(s) farmacéuticamente activo(s), tal como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los utilizados convencionalmente para el material del TCR de la invención particular bajo 60 consideración. Tales portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad bajo las condiciones de uso.

De esta manera, también se proporciona una composición farmacéutica, que comprende cualquiera de los productos de la invención descritos en la presente y materiales del TCR de la invención, específicamente cualesquier proteínas, ácidos nucleicos o células hospederas. En una realización preferible, la composición farmacéutica es adecuada para uso en terapia inmunológica, preferiblemente terapia celular adoptiva.

5 Preferiblemente, el material del TCR de la invención se administra mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa. Cuando el material del TCR de la invención es una célula hospedera que expresa el TCR de la invención (o una variante funcional del mismo), el portador farmacéuticamente aceptable para las células inyectables puede incluir cualquier portador isotónico como, por ejemplo, salina normal (alrededor de 0.90% p/v de NaCl en agua, alrededor de 300 mOsm/L de NaCl en agua, o alrededor de 9.0 g de NaCl por litro de agua), solución electrolítica NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), 10 alrededor de 5% de dextrosa en agua, o lactato de Ringer. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable se complementa con albúmina de suero humano.

15 Para los propósitos de la invención, la cantidad o dosis (por ejemplo, números de células cuando el material del TCR de la invención es una o más células) del material del TCR de la invención administrado puede ser suficiente para afectar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un periodo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material del TCR de la invención debería ser suficiente para unirse a un antígeno cancerígeno, o detectar, tratar o prevenir el cáncer en un periodo de alrededor de 2 horas o más, por ejemplo, 12 a 24 horas o más, desde el momento de la administración. En ciertas 20 realizaciones, el periodo de tiempo podría ser incluso mayor. La dosis se determinará por la eficacia del material del TCR de la invención particular y la condición del animal (por ejemplo, humano), así como del peso corporal del animal (por ejemplo, humano) a tratar.

25 Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la invención, las construcciones de reconocimiento del antígeno, los TCRs (incluyendo las variantes funcionales de los mismos), los polipéptidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospederas o las poblaciones de células sean adecuados para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, o de la pre malignidad positiva para TAA. Se cree que los TCR de la invención (y las variantes funcionales de los mismos) se unen específicamente al TAA de la invención, de tal manera que el TCR (o polipéptido o proteína de la invención relacionado y las variantes funcionales del mismo), cuando se expresa por o en una célula, tal como una célula T, es capaz de mediar una respuesta inmune contra una célula diana que expresa el TAA de la invención, presentando preferiblemente péptidos TAA a través del MHC I o II en la superficie de dicha célula diana. En este respecto, 30 la invención proporciona composiciones farmacéuticas, construcciones de reconocimiento del antígeno, TCRs (incluyendo las variantes funcionales del mismo), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospederas, o poblaciones de células para uso en el tratamiento o la prevención de una afección, en particular cáncer, en un mamífero, que comprende administrar al mamífero 35 cualquier de las composiciones farmacéuticas, construcciones de reconocimiento del antígeno, en particular TCRs (y variantes funcionales de los mismos), 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 TCRs (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas descritas en la presente, o cualquier célula hospedera o población de células que comprenda un ácido nucleico o vector 40 recombinante que codifica para cualquiera de las construcciones de la invención (y variantes funcionales de las mismas), polipéptidos o proteínas descritos en la presente, en una cantidad eficaz para uso en el tratamiento o la prevención de la afección en el mamífero, en el que la afección es preferiblemente cáncer, tal como un cáncer que expresa el TAA de la invención.

45 Ejemplos de portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención incluyen estabilizadores tales como SPGA, carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas como suero bovino o leche sin grasa y amortiguadores (por ejemplo, amortiguador fosfato).

50 Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras derivadas de los mismos, tal y como se utilizan en la presente, no implican necesariamente un tratamiento o prevención del 100% o completo. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención que una persona con habilidades ordinarias en la técnica reconoce como potencialmente beneficiosos o terapéuticos. En este sentido, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de una afección en un mamífero. Además, el uso de la invención para tratar o prevenir puede incluir el tratamiento o prevención de una o más 55 afecciones o síntomas de la afección, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, tratar o prevenir puede incluir promover la regresión de un tumor. Además, para los propósitos de la presente, "prevención" puede abarcar el retraso de la aparición de la enfermedad, o de un síntoma o afección de la misma.

60 La presente invención también se refiere a un TCR, un ácido nucleico o una célula hospedera de la presente descripción en combinación con al menos un agente quimioterapéutico y/o radioterapia para uso en el tratamiento del cáncer que comprende la administración de dicho TCR, ácido nucleico o célula hospedera en combinación con al menos un agente quimioterapéutico y/o radioterapia.

Otro aspecto de la invención se refiere adicionalmente a un método para detectar una proteína TAA, o un complejo del MHC y la proteína TAA (epítope proteico del TAA), en una muestra (biológica), tal como una obtenida de un sujeto o paciente, que comprende poner en contacto la muestra con una construcción de reconocimiento del antígeno que se une específicamente a dicho péptido TAA, o al complejo péptido TAA/MHC, y detectar la unión entre dicha construcción de reconocimiento del antígeno y dicho péptido TAA, o al complejo péptido TAA/MHC. En algunas realizaciones, la construcción de reconocimiento del antígeno es un TCR o anticuerpo, o construcciones similares, o preferiblemente la construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la invención descrita en la presente. En algunas realizaciones, la muestra (biológica) es una muestra de un tumor o un cáncer (como uno de los descritos en otra parte en la presente), por ejemplo, una muestra que comprende células tumorales o cancerosas.

También se proporciona una pluralidad de células transformadas para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto con necesidad del mismo, en el que la pluralidad de células transformadas se obtiene por un método que comprende los siguientes pasos:

- a) aislar una célula de dicho sujeto;
- b) transformar la célula con al menos un vector que codifica para una construcción de reconocimiento del antígeno de la presente invención para producir una célula transformada;
- c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) administrar la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se proporciona una pluralidad de células transformadas para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto con necesidad del mismo, en el que la pluralidad de células transformadas se obtiene por un método que comprende los siguientes pasos:

- a) aislar una célula de un donador sano;
- b) transformar la célula con un vector que codifica para una construcción de reconocimiento del antígeno de la presente invención para producir una célula transformada;
- c) expandir la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) administrar la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se proporciona un método de detección de cáncer en una muestra biológica que comprende:

- a) poner en contacto la muestra biológica con una construcción de reconocimiento del antígeno de la presente descripción;
- b) detectar la unión de la construcción de reconocimiento del antígeno a la muestra biológica.

En algunas realizaciones, el método de detección del cáncer se lleva a cabo *in vitro* o *in situ*.

También se proporciona un método para detectar la presencia de una afección en un mamífero. El método comprende poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con cualquiera de los TCRs de la invención (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospederas, poblaciones de células, anticuerpos, o porciones de unión al antígeno de los mismos, o composiciones farmacéuticas descritas en la presente, formando así un complejo, y detectando el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de la afección en el mamífero, en el que la afección es cáncer, tal como una neoplasia maligna que expresa TAA.

Con respecto al método de la invención de detectar una afección en un mamífero, la muestra de células puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de las mismas, o una fracción de los lisados de células completas, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción de proteína completa, o una fracción de ácido nucleico.

Para los propósitos del método de detección de la invención, el contacto es *in vitro*.

También, la detección del complejo puede ocurrir mediante cualquier número de maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los construcciones de reconocimiento del antígeno de la invención (y las variantes funcionales de las mismas), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospederas, poblaciones de células, o anticuerpos o TCRs, o porciones de unión al antígeno de los mismos, descritos en la presente, se pueden etiquetar con una etiqueta detectable como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

Para los propósitos de usos de la invención, en los que se administran células hospederas o poblaciones de células, las células pueden ser alogénicas o autólogas del mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas del mamífero.

- Con respecto a las aplicaciones médicas antes mencionadas del material TCR de la invención, y su uso en el tratamiento y/o diagnóstico del cáncer, el cáncer a tratar y/o diagnosticar puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o anorrecto, cáncer de ojo, cáncer de conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal, oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer del pene, cáncer del páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer del recto, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de la uretra y cáncer de vejiga urinaria. Un cáncer preferible es cáncer de cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva o pene. Un cáncer particularmente preferible es un cáncer positivo para TAA, tal como un cáncer que expresa PRAME, por ejemplo, carcinoma de ovario, melanoma o leucemia.
- En general, la invención proporciona construcciones de reconocimiento del antígeno, ácidos nucleicos, vectores, composiciones farmacéuticas y/o células hospederas como se divulga por la presente invención para uso en el tratamiento de un sujeto que sufre de un tumor o una enfermedad tumoral que comprende la administración de dichas construcciones de reconocimiento del antígeno, ácidos nucleicos, vectores, composiciones farmacéuticas y/o célula hospedera. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto con necesidad de dicho tratamiento. El sujeto en las realizaciones preferibles es un sujeto mamífero, preferiblemente un paciente humano, que sufre de un tumor o una enfermedad tumoral, que es positiva para TAA.

La presente invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas. Las Figuras y Secuencias muestran:

Figura 1: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R11P3D3 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina o treonina en las posiciones 1-9 (X1-X9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diversos donadores diferentes con respecto a las variantes de sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 2: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina o treonina en las posiciones 1-9 (X1-X9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diversos donadores diferentes con respecto a las variantes de sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 3: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R16P1E8 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina o treonina en las posiciones 1-9 (X1-X9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diversos donadores diferentes con respecto a las variantes de sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 4: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1A9 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina en las posiciones 1-9 (X1-X9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-106) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores con respecto a las variantes de sustitución de alanina (Ala_IFN-040 y Ala_IFN-041).

Figura 5: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1D7 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina o treonina en las posiciones 1-9 (X1-X9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126).

5 Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores con respecto a las variantes de sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y de treonina (Thr_TCRA-0036).

10 Figura 6: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1G3 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina o treonina en las posiciones 1-9 (X1-X9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas 15 sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores con respecto a las variantes de sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y de treonina (Thr_TCRA-0036).

20 Figura 7: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P2B6 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina o treonina en las posiciones 1-9 (X1-X9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas 25 sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores con respecto a las variantes de sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y de treonina (Thr_TCRA-0036).

25 Figura 8: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R11P3D3 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar pero no relacionado TMED9-001 (SEQ ID NO:116), CAT-001 (SEQ ID NO:117), DDX60L-001 (SEQ ID NO:118), LRRC70-001 (SEQ ID NO:119), PTPLB-001 (SEQ ID NO:120), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 121), VPS13B-002 (SEQ ID NO:122), ZNF318-001 (SEQ ID NO:123), CCDC51-001 (SEQ ID NO:124) o IFIT1-001 (SEQ ID NO:125) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los 30 datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores, IFN-040 e IFN-041.

35 Figura 9: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar pero no relacionado TMED9-001 (SEQ ID NO:116), CAT-001 (SEQ ID NO:117), DDX60L-001 (SEQ ID NO:118), LRRC70-001 (SEQ ID NO:119), PTPLB-001 (SEQ ID NO:120), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 121), VPS13B-002 (SEQ ID NO:122), ZNF318-001 (SEQ ID NO:123), CCDC51-001 (SEQ ID NO:124) o IFIT1-001 (SEQ ID NO:125) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los 40 datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores, IFN-046 e IFN-041.

45 Figura 10: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R16P1E8 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar pero no relacionado TMED9-001 (SEQ ID NO:116), CAT-001 (SEQ ID NO:117), DDX60L-001 (SEQ ID NO:118), LRRC70-001 (SEQ ID NO:119), PTPLB-001 (SEQ ID NO:120), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 121), VPS13B-002 (SEQ ID NO:122), ZNF318-001 (SEQ ID NO:123), CCDC51-001 (SEQ ID NO:124) o IFIT1-001 (SEQ ID NO:125) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los 50 datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores, IFN-040 e IFN-041.

55 Figura 11: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1A9 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar pero no relacionado TMED9-001 (SEQ ID NO:116), CAT-001 (SEQ ID NO:117), DDX60L-001 (SEQ ID NO:118), LRRC70-001 (SEQ ID NO:119), PTPLB-001 (SEQ ID NO:120), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 121), VPS13B-002 (SEQ ID NO:122), ZNF318-001 (SEQ ID NO:123), CCDC51-001 (SEQ ID NO:124) o IFIT1-001 (SEQ ID NO:125) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los 60 datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores, IFN-040 e IFN-041.

Figura 12: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1D7 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar pero no relacionado TMED9-001 (SEQ ID NO:116), CAT-001 (SEQ ID NO:117), DDX60L-001 (SEQ ID NO:118), LRRC70-001 (SEQ ID NO:119), PTPLB-001 (SEQ ID NO:120), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 121), VPS13B-002 (SEQ ID NO:122), ZNF318-001 (SEQ ID NO:123), CCDC51-001 (SEQ ID NO:124) o IFIT1-001 (SEQ ID NO:125) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores, IFN-040 e IFN-041.

Figura 13: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1G3 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar pero no relacionado TMED9-001 (SEQ ID NO:116), CAT-001 (SEQ ID NO:117), DDX60L-001 (SEQ ID NO:118), LRRC70-001 (SEQ ID NO:119), PTPLB-001 (SEQ ID NO:120), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 121), VPS13B-002 (SEQ ID NO:122), ZNF318-001 (SEQ ID NO:123), CCDC51-001 (SEQ ID NO:124) o IFIT1-001 (SEQ ID NO:125) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores, IFN-046 e IFN-041.

Figura 14: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P2B6 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar pero no relacionado TMED9-001 (SEQ ID NO:116), CAT-001 (SEQ ID NO:117), DDX60L-001 (SEQ ID NO:118), LRRC70-001 (SEQ ID NO:119), PTPLB-001 (SEQ ID NO:120), HDAC5-001 (SEQ ID NO: 121), VPS13B-002 (SEQ ID NO:122), ZNF318-001 (SEQ ID NO:123), CCDC51-001 (SEQ ID NO:124) o IFIT1-001 (SEQ ID NO:125) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Las células T CD8+ electroporadas con ARN solas o en coincubación con células diana no cargadas sirvieron como control. Se analizaron diferentes donadores, IFN-040 e IFN-041.

Figura 15: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R11P3D3 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) en diversas concentraciones de carga del péptido de 10 μ M a 10pM. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Se analizaron diferentes donadores, TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 16: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) en diversas concentraciones de carga del péptido de 10 μ M a 10pM. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Se analizaron diferentes donadores, TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 17: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R16P1E8 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) en diversas concentraciones de carga del péptido de 10 μ M a 10pM. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Se analizaron diferentes donadores, TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 18: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1D7 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) en diversas concentraciones de carga del péptido de 10 μ M a 10pM. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Se analizaron diferentes donadores, TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 19: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P1G3 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) en diversas concentraciones de carga del péptido de 10 μ M a 10pM. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Se analizaron diferentes donadores, TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 20: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R17P2B6 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID NO:97) en diversas concentraciones de carga del péptido de 10 μ M a 10pM. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes. Se analizaron diferentes donadores, TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 21: Tinción del tetrámero HLA-A*02/PRAAME-004 o del tetrámero HLA-A*02/NYES01-001, respectivamente, de células T CD8+ electroporadas con ARN de cadena alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1). Las células T CD8+ electroporadas con ARN del TCR 1G4 (SEQ ID: 85-96) que se une específicamente al complejo HLA-A*02/NYES01-001 y células T CD8+ electroporadas simuladas sirvieron como control.

5 Figura 22: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ transducidas lentiviramente con el TCR R11P3D3 (Tabla 1) (D103805 y D191451) o células no transducidas (D103805 NT y D191451 NT) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con 100nM del péptido PRAAME-004 (SEQ ID NO:97) o los péptidos similares (idénticos a PRAAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados ACPL-001 (SEQ ID NO:139), HSPB3-001 (SEQ ID NO:140), UNC7-001 (SEQ ID NO: 141), SCYL2-001 (SEQ ID NO:142),
10 RPS2P8-001 (SEQ ID NO:143), PCNXL3-003 (SEQ ID NO:144), AQP6-001 (SEQ ID NO:145), PCNX-001 (SEQ ID NO:146), AQP6-002 (SEQ ID NO:147) TRGV10-001 (SEQ ID NO:148), NECAP1-001 (SEQ ID NO:149) o FBXW2-001 (SEQ ID NO:150) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, D103805 y D191451.

15 Figura 23: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ transducidas lentiviramente con TCR R11 P3D3 (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con 100nM del péptido PRAAME-004 (SEQ ID NO:97) o los péptidos similares (idénticos a PRAAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados (SEQ ID NO:151-195) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, TCRA-0087 y TCRA-0088.

20 Figura 24: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ transducidas lentiviramente con TCR R11P3D3 (Tabla 1) (D103805 y D191451) o células no transducidas (D103805 NT y D191451 NT) después de la coincubación con diferentes células primarias (HCASMC (células de músculo liso de arteria coronaria), HTSMC (células de músculo liso traqueal), HRCEpC (células epiteliales corticales renales), HCM (cardiomiocitos), HCMEC (células endoteliales microvasculares cardíacas), HSAEpC (células epiteliales pequeñas de las vías respiratorias), HCF (fibroblastos cardíacos)) y tipos celulares derivados de iPSC (neuronas HN), IHCM (cardiomiocitos), HH (hepatocitos), HA (astrocitos)). Las líneas celulares tumorales UACC-257 (PRAAME-004 alto), Hs695T (PRAAME-004 medio), U266B1 (PRAAME-004 muy bajo) y MCF-7 (sin PRAAME-004) presentan diferentes cantidades de PRAAME-004 por célula. Las células T solas sirvieron como control. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, D103805 y D191451.

25 Figura 25: Liberación de IFNy a partir células T CD8+ transducidas lentiviramente con TCR R11P3D3 (Tabla 1) después de la coincubación con diferentes células primarias (NHEK (queratinocitos epidérmicos), HBEPc (células epiteliales bronquiales), HDMEC (células endoteliales de la microvasculatura dérmica), HCAEC (células endoteliales de la arteria coronaria), HAoEC (células endoteliales aórticas), HPASMC (células musculares lisas de la arteria pulmonar), HAoSMC (células musculares lisas aórticas), HPF (fibroblastos pulmonares), SkMC (células musculares esqueléticas), HOB (osteoblastos), HCH (condrocitos), HWP (preadipocitos blancos), hMSC-BM (células madre mesenquimales), NHDF (fibroblastos dérmicos). Las líneas celulares tumorales UACC-257 (PRAAME-004 alto), Hs695T (PRAAME-004 medio), U266B1 (PRAAME-004 muy bajo) y MCF-7 (sin PRAAME-004) presentan diferentes copias de PRAAME-004 por célula. Las células T solas sirvieron como control. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, TCRA-0084 y TCRA-0085.

30 Figura 26: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ transducidas lentiviramente con TCR mejorado R11P3D3_KE (Tabla 1) (D103805 y D191451) o células no transducidas (D103805 NT y D191451 NT) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con 100 nM del péptido PRAAME-004 (SEQ ID NO:97) o el péptido similar (idéntico a PRAAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionado ACPL-001 (SEQ ID NO:139), HSPB3-001 (SEQ ID NO:140), UNC7-001 (SEQ ID NO: 141), SCYL2-001 (SEQ ID NO:142),
35 RPS2P8-001 (SEQ ID NO:143), PCNXL3-003 (SEQ ID NO:144), AQP6-001 (SEQ ID NO:145), PCNX-001 (SEQ ID NO:146), AQP6-002 (SEQ ID NO:147), TRGV10-001 (SEQ ID NO:148), NECAP1-001 (SEQ ID NO:149) o FBXW2-001 (SEQ ID NO:150) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, D103805 y D191451.

40 Figura 27: Liberación de IFNy a partir células T CD8+ transducidas lentiviramente con TCR mejorado R11 P3D3_KE (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con 100nM del péptido PRAAME-004 (SEQ ID NO:97) o los péptidos similares (idénticos a PRAAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados (SEQ ID NO:151-195) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID NO:126). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, TCRA-0087 y TCRA-0088.

45 Figura 28: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ transducidas lentiviramente con el TCR mejorado R11P3D3_KE (Tabla 1) (D103805 y D191451) o células no transducidas (D103805 NT y D191451 NT) después de la coincubación con diferentes células primarias (HCASMC (células musculares lisas de la arteria coronaria), HTSMC (células musculares lisas traqueales), HRCEpC (células epiteliales corticales renales), HCM (cardiomiocitos), HCMEC (células endoteliales microvasculares cardíacas), HSAEpC (células epiteliales pequeñas de las vías respiratorias), HCF (fibroblastos cardíacos)) y tipos celulares derivados de

5 iPSC (neuronas) HN)), iHCM (cardiomiocitos), HH (hepatocitos), HA (astrocitos)). Las líneas celulares tumorales UACC-257 (PRAME-004 alto), Hs695T (PRAME-004 medio), U266B1 (PRAME-004 muy bajo) y MCF-7 (sin PRAME-004) presentan diferentes cantidades de PRAME-004 por célula. Las células T solas sirvieron como control. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, D103805 y D191451.

10 Figura 29: Liberación de IFNy a partir células T CD8+ transducidas lentiviramente con TCR mejorado R11P3D3 KE (Tabla 1) después de la coincubación con diferentes células primarias (NHEK (queratinocitos epidérmicos), HBEPc (células epiteliales bronquiales), HDMEC (células endoteliales de la microvasculatura dérmica), HCAEC (células endoteliales de la arteria coronaria), HAoEC (células endoteliales aórticas), HPASMC (células musculares lisas de la arteria pulmonar), HAoSMC (células musculares lisas aórticas), HPF (fibroblastos pulmonares), SkMC (células musculares esqueléticas), HOB (osteoblastos), HCH (condrocitos), HWP (preadipocitos blancos), hMSC-BM (células madre mesenquimales), NHDF (fibroblastos dérmicos). Las líneas celulares tumorales UACC-257 (PRAME-004 alto), Hs695T (PRAME-004 medio), U266B1 (PRAME-004 muy bajo) y MCF-7 (sin PRAME-004) presentan diferentes copias de PRAME-004 por célula. Las células T solas sirvieron como control. Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de dos donadores sanos diferentes, TCRA-0084 y TCRA-0085.

15 Figura 30: Liberación de IFNy a partir de células T CD8+ transducidas lentiviramente con TCR R11P3D3 o TCR mejorado R11P3D3 KE (Tabla 1) o células no transducidas después de la coincubación con líneas celulares tumorales UACC-257 (PRAME-004 alto), Hs695T (PRAME-004 medio), U266B1 (PRAME-004 muy bajo) y MCF-7 (sin PRAME-004) presentan diferentes cantidades de PRAME-004 por célula. Las células T solas sirvieron como control. La liberación de IFNy de ambos TCRs se correlaciona con la presentación de PRAME-004 y R11P3D3 KE induce respuestas más altas en comparación con R11P3D3.

20 Figura 31: Liberación de IFNy a partir células T CD8+ transducidas lentiviramente con células TCR mejoradas R11P3D3 KE (Tabla 1) después de la coincubación con células diana T2 cargadas con diversas variantes de PRAME-004 con sustitución de alanina en las posiciones 1-9 (A1-A9) de SEQ ID NO:97 (SEQ ID NO:98-106). Los datos de liberación de IFNy se obtuvieron con células T CD8+ derivadas de tres donadores sanos diferentes.

25 Figura 32: Ensayo de potencia que evalúa la actividad citolítica de células T transducidas lentiviramente que expresan TCR R11P3D3 o TCR mejorado R11P3D3 KE contra células tumorales PRAME-004+. La respuesta citotóxica de las células T transducidas y no transducidas (NT) con R11P3D3 y R11P3D3 KE medida frente a las células tumorales A-375 (PRAME-004 bajo) o U2OS (PRAME-004 medio). Los ensayos se realizaron en un ensayo de citotoxicidad de 72 horas basado en microscopía de fluorescencia. Los resultados se muestran como veces del crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

Tabla 1. Secuencias del TCR de la inyección

(Continuación)

SE Q ID NO:	TCR	Cadena	Region	Secuencia
14	R16P1C10	alfa	CDR2	Y
15	R16P1C10	beta	CDR3	CAAVISNGDKEDGRFTAQNLWASQVLSLRSOPSDSATYLCAAVNSFQMEKLTFGTGTTRIP
16	R16P1C10	alfa	dominio variable	MKSRLVILVILWLDIISWNSQKEVNQSGPSPWEGASLNCTYSORGQSFFMYFQYSGKSAEIMFYSNGDKEDGRFTAQNLWASQVLSLRSOPSDSATYLCAAVNSFQMEKLTFGTGTTRIP
17	R16P1C10	alfa	dominio constante	MIONPDPAVYOLRDSKSSOKSVCLFTOFDSQTNSOSKDSDVYTDTKVLDLDRSMICPKNSAVAMSNKSDFACANAFNKSPEDEFFPSPESSCDVLYKEKFETOTNLNFOMNSYMGPRILLKVAQFNLLMLPLWSS
18	R16P1C10	alfa	longitud completa	MKSRLVILVILWLDIISWNSQKEVNQSGPSPWEGASLNCTYSORGQSFFMYFQYSGKSAEIMFYSNGDKEDGRFTAQNLWASQVLSLRSOPSDSATYLCAAVNSFQMEKLTFGTGTTRIPDNQNPDPAVYOLRDSKSSOKSVCLFTOFDSQTNSOSKDSDVYTDTKVLDLDRSMICPKNSAVAMSNKSDACANAFNKSPEDEFFPSPESSCDVLYKEKFETOTNLNFOMNSYMGPRILLKVAQFNLLMLPLWSS
19	R16P1C10	beta	CDR1	SCKRS
20	R16P1C10	beta	CDR2	YFSETQ
21	R16P1C10	beta	CDR3	CASSPWNMNEONF
22	R16P1C10	beta	dominio variable	MGSRLLQWLWLLGASPVKAGVTOPTPYLKIKRGCVTLSCSPISCHRSVWYQQTQGCGLOFLFVFSETQRNKGNNPGRFSGROFSNSRSEMNSTLGDSDALYLCASSPACSPNEQYFPGTGTTRIV
23	R16P1C10	beta	dominio constante	EIDKNVFPPEVAVEPSEAELSHOKATLVCLATGFYDPDHVELSWWNVNGKEVHSGVSTMDPQKEDPALKDSDRYCQYLSRVSATWQMPRNHFRCQYFGLESENJEWTODAKPVTDVSAEWGRACDFTSESYQQGVLSATLYELLQKATLYAVLVSALVMAWVKWDGRC
24	R16P1C10	beta	longitud completa	MGSRLLQWLWLLGASPVKAGVTOPTPYLKIKRGCVTLSCSPISCHRSVWYQQTQGCGLOFLFVFSETQRNKGNNPGRFSGROFSNSRSEMNSTLGDSDALYLCASSPACSPNEQYFPGTGTTRIVDLKWFPPPEVAVEPSEAELSHOKATLVCLATGFYDPDHVELSWWNVNGKEVHSGVSTMDPQKEDPALKDSDRYCQYLSRVSATWQMPRNHFRCQYFGLESENJEWTODAKPVTDVSAEWGRACDFTESYQQGVLSATLYELLQKATLYAVLVSALVMAWVKWDGRC
25	R16P1C10	beta	363	CDR1 NSAQY
26	R16P1E8	alfa	CDR2	Y

(continuación)

SEQ ID NO.	TCR	Cadena	Región	Secuencia
27	R16P1E8	alfa	COR3	CAMSERAGMCKTF
28	R16P1E8	alfa	dominio variable	MKKSRLRVLLVILMLSWWNSQKEVEQDOPGPLSVFEGAVSILCTYSNSAFOYFMARYROYSRKGP ELMMTYTSSGNKEGRFTAQMDKSSKYISPIROSOPSDSATYLCAAMSEAAGNKLTFGCGTRVLVPP
29	R16P1E8	beta	dominio constante	NIGNDPDAVYQLRDKSSDKSVOLFTDFDSQTNVSSOSKOSOYITDVKVTDMSMDFKSNSAVAWSN KSDFACACANAFNNNSHPEDTFFPSPESSCDVKEVSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLUKVAGFNLLMTLRL WSS
30	R16P1E8	alfa	longitud completa	MKKSRLRVLLVILMLSWWNSQKEVEQDOPGPLSVFEGAVSILCTYSNSAFOYFMARYROYSRKGP ELMMTYTSSGNKEGRFTAQMDKSSKYISPIROSOPSDSATYLCAAMSEAAGNKLTFGCGTRVLVPP QNPDPAYVOLRDKSSDKSVCLFTFDSDQTNVSSOSKOSOYITDVKVTDMSMDFKSNSAVAWSNKS DFACACANAFNNNSHPEDTFFPSPESSCDVKEVSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLUKVAGFNLLMTLRL S
31	R16P1E8	beta	COR1	SGHAT
32	R16P1E8	beta	COR2	FQNNGV
33	R16P1E8	beta	COR3	CASSTYNGCEAFF
34	R16P1E8	beta	dominio variable	MGTRLLCWAALQGAELTEAGVACSPRYKIEKROSYAVFCWNPSPGHATLYWQQLSCGPKLUQFC WNGVVDQDOLPKDRAFTKQPAKLEDASVYLCASETWNGEAFFGQSTRLTW
35	R16P1E8	beta	dominio constante	ELMKKFVPEAVFEPSEAEISHITOKATLYCIALETFPDHVLSWVNGKEVHSQVSTDPOPKEQPA LNDSSRYCLOSSRLRVSAATPQMPRNHRFCQVGFGLSENDEWTGCRAPVQIVSAAWGRADGFT SYQGQGVSATLYEILGKAUYAVLVSALVLMAMVYRKDF
36	R16P1E8	beta	longitud completa	MGTRLLCWAALQGAELTEAGVACSPRYKIEKROSYAVFCWNPSPGHATLYWQQLSCGPKLUQFC WNGVVDQDOLPKDRAFTKQPAKLEDASVYLCASETWNGEAFFGQSTRLTW VFPEEVAVFEPSEAEISHITOKATLYCIALETFPDHVLSWVNGKEVHSQVSTDPOPKEQPA RYCLOSSRLRVSAATPQMPRNHRFCQVGFGLSENDEWTGCRAPVQIVSAAWGRADGFTSVSY QGQVLSATLYEILGKAUYAVLVSALVLMAMVYRKDF
37	R17P1E9	alfa	COR1	DRCGKS
38	R17P1E9	beta	COR2	W

(continuación)

SE QIB NO.	TCR	Cadena	Región	Secuencia
39	R17P1A8	alfa	CDR3	CAVNGACTAIF
40	R17P1A8	alfa	dominio variable	MKSLRVLLVILWCLSWWYNSQKEVEONSGPLSYPEGAASLNLCTYSDRGSSQSFFPVNYRQYSSGKSPEL MSYSGDKEDEGRFTAQINAKASQVSLLIIRDOPSCSATYLCAVINNOAGTALIFGKGTTLSVSS
41	R17P1A8	alfa	domino constante	NIONPCPAVYCLRDSSDKSSVCLTFDOSOTNVSCKSDOSVYIUKIVLDMRSMUFKNSAVAMSN KSDFACANAFNNNSIPEDTFFPSPESSCDVLYEKSFETOTNLNFONLSVIGFILLKXAGFLMLTRL WSS
42	R17P1A8	alfa	longitud completa	MKSLRVLLVILWCLSWWYNSQKEVEONSGPLSYPEGAASLNLCTYSDRGSSQSFFPVNYRQYSSGKSPEL MSYSGDKEDEGRFTAQINAKASQVSLLIIRDOPSCSATYLCAVINNOAGTALIFGKGTTLSVSSNQIP DFAVYQLRDSSDKSSOSVCLFTDOSOTNVSOKSDOSVLTDTFLDMRSMUFKNSAVAMSNKSFIA CANAFNNSIPEDTFFPSPESSCDVLYEKSFETOTNLNFONLSVIGFILLKXAGFLMLTRLWSS
43	R17P1A8	beta	CDR1	SGDS
44	R17P1A8	beta	CDR2	YYGEE
45	R17P1A8	beta	CDR3	CASSAETGPWLGNEOFF
46	R17P1A8	beta	dominio variable	MGFRLCCVAFCOLGAGSPVSSGVTOITPKHUTATGDRVTVLSPRSGLSYWYQASLXQGLOFLDY YNGEEERAKGNLIERFSQAQFPFLHSSELNLSSLELGDSALYFCASSAETGPWLGNEOFFGPCTRLTVL
47	R17P1A8	beta	domino constante	EDLKNWVPPPEVAIFPSESEAISHTOKATLICLAFYPOHVLSWVNGKEVHSGVSTDPKPTVSAEAWGRACCAF ALNDNSRCYCLSSRLRVSATPFRQNPFRNHFFCVOYCYLSENEDWTODRAKPTVSAEAWGRACCAF TSESYQQGVLSATLYELLGKATLYAVLVSALVMAMWKRDSRG
48	R17P1A8	beta	longitud completa	MGFRLCCVAFCOLGAGSPVSSGVTOITPKHUTATGDRVTVLSPRSGLSYWYQASLXQGLOFLDY YNGEEERAKGNLIERFSQAQFPFLHSSELNLSSLELGDSALYFCASSAETGPWLGNEOFFGPCTRLTVL DLKNWVPPPEVAIFPSESEAISHTOKATLICLAFYPOHVLSWVNGKEVHSGVSTDPKPTVSAEAWGRACCAF NCSAYVCLSSRLRVSATPFRQNPFRNHFFCVOYCYLSENEDWTODRAKPTVSAEAWGRACCAF ESYQQGVLSATLYELLGKATLYAVLVSALVMAMWKRDSRG
49	R17P1D7	alfa	CDR1	TSESOY
50	R17P1D7	alfa	CDR2	QEAY
51	R17P1D7	alfa	CDR3	CAYRMWQSSSERLKF

(Continuación)

SEQ ID NO.	TCR	Cadena	Región	Secuencia
52	R17P1D7	alfa	de nimic variable	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTIVTOSCOPEMSVQEAETVTLSCTYDTSSESDYILFWYKOPPSROMILV IRQEAYKQONATEKRFNSVNFOKAAKSFSLKISLGSQSEKLVFGKGTKLTWN P
53	R17P1D7	alfa	dominio constante	YIQKFDPAVYOLROSSEOKSVOLFDFDSQATIVSOSKOSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSNSAVAVSN KSDFACANAFNNSHPEOTFFPSPESSCOKVKEVKSFETDTNLNQNLSVIGFRILLKVAGENLMLTTLR WSS
54	R17P1D7	alfa	lengitud completa	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTIVTOSCOPEMSVQEAETVTLSCTYDTSSESDYILFWYKOPPSROMILV IRQEAYKQONATEKRFNSVNFOKAAKSFSLKISLGSQSEKLVFGKGTKLTWN PYIOKPDPAVYOLRDKSSDKSVGLFTDFDISCTNVSOSKOSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSNSAVAVSN NKSDFACANAFNNSHPEOTFFPSPESSCOKVKEVKSFETDTNLNQNLSVIGFRILLKVAGENLMLTTLR WSS
55	R17P1D7	beta	CDR1	NGEIK
56	R17P1D7	beta	CDR2	SYGVAS
57	R17P1D7	beta	CDR3	CATEIWSGGTGELPF
58	R17P1D7	beta	dominio variable	MIRLUCLYMGFYFLQAGLMEEADYQTPRYLVIGSTGKXKITLECOSGMXHDKAYWYQODPMELAHLYHS YGVNSTEKCGLSSSETIVSRIRTEHFPLTESARPSHTSYCYLCATEIHWSSGAGTGELFFGEGSRLTVL
59	R17P1D7	beta	dominio constante	EDLKNFPPPEAVEPSEAEISHTGATLWCLATGFYPOWVWLSRSGVSTCPQLKEQP ALNDNSRCYCLSSRLRVSAATPNQKPRHFRCOVQFYSENDEWTCDRAKPVTOVSAAWGRADGFG TSESYQCVSLAIIYELUQKATLYAVLVSALVLMAMVKRDSRG
60	R17P1D7	beta	lengitud completa	MIRLUCLYMGFYFLQAGLMEEADYQTPRYLVIGSTGKXKITLECOSGMXHDKAYWYQODPMELAHLYHS YGVNSTEKCGLSSSETIVSRIRTEHFPLTESARPSHTSYCYLCATEIHWSSG1GELFFGEGSRLTVL LAKWFFPPEAVFEPSEAEISHTGATLWCLATGFYPOWVWLSRSGVSTCPQLKEQP DSRYCULSSRLRVSAATPNQKPRHFRCOVQFYCILSENDEWTCDRAKPVTOVSAAWGRADGFGTSE SYQCVSLAIIYELUQKATLYAVLVSALVLMAMVKRDSRG
61	R17P1G3	alfa	CDR1	DRCGCS
62	R17P1G3	alfa	CDR3	IV

(continuación)

SE Q ID NO:	TCR	Cadena	Región	Secuencia
63	R11P1G3	alfa	C3R3	CAGPSSSTYKF
64	R11P1G3	alfa	dominio variable	MKSLRVLVILWLQLSWWNSCOKEVEONSCPLSWFEGALASLNCTNSDGSOSFPWYROYSGKSPEL MSYNGKEDKGFTAQLNKAQYVSLRLDQSQQPSATYLCAPSCATYKIEFGTGTTRIKVLA
65	R11P1G3	alfa	dominio constante	NIONPDPAVYGLROSQSKSDKSVCLPTDFQSOIWNVSQSKDPSDQSYVTDKTVDLDRMSADFKNSAVANS KSDFACANAFNNSIPEDTFFPSPESSCDVKEKSFETOTLNFLQNLWSIGFRILLKVAQFNLMITFLPL WSS
66	R11P1G3	beta	longitud completa	MKSLRVLVILWLQLSWWNSCOKEVEONSCPLSWFEGALASLNCTNSDGSOSFPWYROYSGKSPEL MSYNGKEDKGFTAQLNKAQYVSLRLDQSQQPSATYLCAPSCATYKIEFGTGTTRIKVLA DAVYGLROSQSKSDKSVCLPTDFQSOIWNVSQSKDPSDQSYVTDKTVDLDRMSADFKNSAVANSKSCFA CANAFNNSIPEDTFFPSPESSCDVKEKSFETOTLNFLQNLWSIGFRILLKVAQFNLMITFLPL WSS
67	R11P1G3	beta	C3R1	MNHEY
68	R11P1G3	beta	C3R2	SMRVEV
69	R11P1G3	beta	C3R3	CASSPGGGSGNEOFF
70	R11P1G3	beta	dominio variable	MGPOLLGYWVCLGAGPLEAOVTONPRYLTVTKKLTVTCOMMNNHEYMWSWYQDPLGLRQYY SMAVVEVTDKGDYEGYKVSKERKMFAPLIESPSNOTSLYFCASSPGGSNEOFFGPGLTRLTVL
71	R11P1G3	beta	dominio constante	EDLAKVYFPPVEAVFEPSEAELSHHTOKATLYCLATEFYPOHVELTSWVMMNGKEVHSQVSTDFQPKKEOP ALNCAYCLSSRRYSAIFWQNPNRHFCOYFYSLSENDEWTODRAKPVTOVSAAVGADCCF TSESYQGQVLSATLYELLGKATLYAVALYSAVLMAMVKDSSG
72	R11P1G3	beta	longitud completa	MGPOLLGYWVCLGAGPLEAOVTONPRYLTVTKKLTVTCOMMNNHEYMWSWYQDPLGLRQYY SMAVVEVTDKGDYEGYKVSKERKMFAPLIESPSNOTSLYFCASSPGGSNEOFFGPGLTRLTVL KNVPPPEVANFEPSEAELSHHTOKATLYCLATEFYPOHVELTSWVMMNGKEVHSQVSTDFQPKKEOP DSRYCQCLSSRRYSAIFWQNPNRHFCOYFYSLSENDEWTODRAKPVTOVSAAVGADCCF SYCQGQVLSATLYELLGKATLYAVALYSAVLMAMVKDSSG
73	R11P2G3	alfa	C3R1	DRGSQS
74	R11P2G3	alfa	C3R2	IV
75	R11P2G3	alfa	C3R3	CAPVSGGGGAGQIIF

(Continuación)

SEQ ID NO.	TCR	Cadena	Región	Secuencia
76	R17P2386	alfa	dominio variable	MKSRLVLLVWLOLSSWYNSQKEVEONSCLSYPECMAISLNCTYSDRGSSOSFFAYROYS3KSPERI MFIYSGNGDKEDGRFTAQLNKAQSOYVSLIROSAPSOSATYLCAVSSGGAGDLTFGKGTHLUOP
77	R17P2386	beta	dominio constante	YDQKDPAVYOLRDSSKSDKSVCLFTDFDSQTNSCOSDVIYTDKTIVLDMRSMDFKNSAVAWSNSDF KSDFACANAFNNSIPEDTFFPSPESSCDVILVEKSFEOTDNINFONLSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRL WSS
78	R17P2386	alfa	longitud completa	MKSRLVLLVWLOLSSWYNSQKEVEONSCLSYPECMAISLNCTYSDRGSSOSFFAYROYS3KSPERI MFIYSGNGDKEDGRFTAQLNKAQSOYVSLIROSAPSOSATYLCAVSSGGAGDLTFGKGTHLUOP PIPAVYOLRDSSKSDSVCLETFDSQTNSCOSDVIYTDKTIVLDMRSMDFKNSAVAWSNSDF ACANAFNNSIPEDTFFPSPESSCDVILVEKSFEOTDNINFONLSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
79	R17P2386	beta	CDR1	PRHOT
80	R17P2386	beta	CDR2	RYEKMQ
81	R17P2386	beta	CDR3	CAASLGRCGCGPQAF
82	R17P2386	beta	dominio variable	MLSPDLPOSAWNTRLLCHWNLCLIGAVSVAAGVQSPRHILIKEKRETATLKCPYPRHDTVVWYWWQGP GQDFGLFISFYEKMOSSDKGSIPRFSACQFSOYHSELAMSSLELGDSALYFCASSLGRCGCGPQHFGD GTRUHL
83	R17P2386	beta	dominio constante	EDLNKVFPPPEVAVFEPSEASHTOKATLVCLATGFFPQHVELSVAAGVQSPRHILIKEKRETATLKCPYPRHDTVVWYWWQGP UNDSRYCLESPLRVSVATFWMNPRNNHFCQNYFYGLSENEDWTODRAKPVTIVNSAEAMGRADCFT SYSYDQGVISATLYELLUISKATLYAVLYSALVLMAMYRKDF
84	R17P2386	beta	longitud completa	MLSPDLPOSAWNTRLLCHWNLCLIGAVSVAAGVQSPRHILIKEKRETATLKCPYPRHDTVVWYWWQGP GQDFGLFISFYEKMOSSDKGSIPRFSACQFSOYHSELAMSSLELGDSALYFCASSLGRCGCGPQHFGD GTRUHLEDLKVFPPPEVAVFEPSEASHTOKATLVCLATGFFPQHVELSVAAGVQSPRHILIKEKRETATLKCPYPRHDTVVWYWWQGP PIKEOPALNDGSRVYCLSRLRVSATFAGNPRHHFCQVOFYGLSENEDWTODRAKPVTIVNSAEAMGRADCFT RADCGFTSVSYQCGVLSATLYELLUISKATLYAVLYSALVLMAMYRKDF
85	1G4	alfa	CDR1	CSAIVN
86	1G4	alfa	CDR2	RS
87	1G4	alfa	CDR3	CAYRPTSGCGSYTFF

(Continuación)

SE Q ID NO:	TCR NO:	TCR	Cadena	Región	Secuencia
88	1G4	alfa	dominio variable	METLGILUWQIOWWSSKCEVTOPIAALSVEGENIVNCFTOSAYNLQMFNFRDPCKGILTSLII QISSOREOTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASOPGOSATYLCAVRRTS3GSYIPTFGRSTLWHP	
89	1G4	alfa	dominio constante	YQNPDPAVYQURDSKSSDKSVOLFEDFOGOTNVSCSKOSDVNTDOKTIVUDMRSMDFKSNSAVANSN KSDFACANAFNNKSIPEDTFFPSPESSCDVRLVEKSFETDTNLNFQNLSVCFRILLKVACGFNLMLTRL WSS	
90	1G4	beta	longitud completa	METLGILUWQIOWWSSKOEVTOPAALSVFEGENIVLNCSITDOSAYNLQMFNFRDPCKGILTSLII QISSOREOTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASOPGOSATYLCAVRRTS3GSYIPTFGRSTLWHPYQNP CFAVYQULRSKSSDKSVCLFTEDFOGOTNVSCSKOSDVNTDOKTIVUDMRSMDFKSNSAVANSNKSFQA CANAFNNKSIPEDTFFPSPESSCDVRLVEKSFETDTNLNFQNLSVCFRILLKVACGFNLMLTRLWSS	
91	1G4	beta	beta	CG81	MMKEY
92	1G4	beta	beta	CG82	SWAGI
93	1G4	beta	beta	CG83	CASSYVONCFELFF
94	1G4	beta	dominio variable	MISGILCCAAISLUWAGPNAQVTOIPKFQVLTGOSMFLQCAODMHEYMSWYRDPGMGLRH YSGAGITDQGEVPGYNGVNRSTTEDFFPLRSAAPSTSIVFCASSYVGNTEGFFGEGSRITVL	
95	1G4	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAEESEAISHIOTAKLVCALATGYPDHVELSWAWNGKEVHSGVSTOPPLKEDP AINDSRYCOLSSRLRVSATMOPPNHERCQVCFYGLSENDEWTQDRAXPVTQVSAAWGRADCGCF	
96	1G4	beta	longitud completa	MISGILCCAAISLUWAGPNAQVTOIPKFQVLTGOSMFLQCAODMHEYMSWYRDPGMGLRH YSGAGITDQGEVPGYNGVNRSTTEDFFPLRSAAPSTSIVFCASSYVGNTEGFFGEGSRITVL IKNVFPPEVAEESEAISHIOTAKLVCALATGYPDHVELSWAWNGKEVHSGVSTOPPLKEDP EGRYCOLSSRLRVSATMOPPNHERCQVCFYGLSENDEWTQDRAXPVTQVSAAWGRADCGCF SYQOQVLSATIYLVLLKATLYALVLSALVLMAMVKKRDSRG	
127	R11P3D3_KE		alfa	CG81	SSNFYA
128	R11P3D3_KE		alfa	CG82	MM

(Continuación)

SE Q ID NO:	TOR NO:	Cadena	Región	Secuencia	
139	R1IP303_... ME	alfa	C3R3	CALYNNKNGKE	
140	R1IP303_... KE	dominio variable	MENPLAARPLILWHDQVSSLNECPOSLSLHVGEGDSTIFTCSFPSSNFTYALHWRKETAKSPEAL	FVMTLNGDEKKGRISATNTKEGSYLHKGSOPEDSATYLCKVNSLWVHWRKETAKSPEAL	
141	R1IP303_... KE	alfa	dominio constante	NICNPDAVYOLRDSKSSOKSVCLFTDFDSQTNVSQSKOSDVYITFKVLDMSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFINSPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFEIDTNLFONLNGCFRLLKVAGFNLMTRI. WSS	FVMTLNGDEKKGRISATNTKEGSYLHKGSOPEDSATYLCKVNSLWVHWRKETAKSPEAL
142	R1IP303_... KE	alfa	longitud completa	MEKNPLAARPLILWHDQVSSLNECPOSLSLHVGEGDSTIFTCSFPSSNFTYALHWRKETAKSPEAL DPAVYOLRDSKSSOKSVCLFTDFDSQTNVSQSKOSDVYITFKVLDMSMDFKSNSAVAWSN CANAPNMNSPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFEIDTNLFONLNGCFRLLKVAGFNLMTRI.WSS	FVMTLNGDEKKGRISATNTKEGSYLHKGSOPEDSATYLCKVNSLWVHWRKETAKSPEAL
143	R1IP303_... ME	beta	C3R1	SEHNS	
144	R1IP303_... KE	beta	C3R2	PHHNSP	
145	R1IP303_... KE	beta	C3R3	CASSPGSTOTQPF	
146	R1IP303_... KE	beta	dominio variable	MDSWTFCCVSCLVAKHTDAGVOSPRHEVTENQEVTLRKPSGHSLWVRETMARGELLYF NNAVFDGSCMPEDRSAMAPNASFSTLKQPSF	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHIKATLVCLATGFYFHVELSWANNGKEVHSQVSTOPFLKEGA ALNDSRVCLSSRIRVSATFWQNPRIHFRCOVOFGLESENDEATQDRAKPVTOVSAAWGRDCGF TSESYQCGVLSATLYELLGKATLYAVLVSALVUMAMYKRDSRG
147	R1IP303_... KE	beta	dominio constante		MDSNTFFCCVSCLVAKHTDAGVOSPRHEVTENQEVTLRKPSB3ANSFLWVRETMARGELLYF NNNPIPDSCMPEDRSAMAPNAESTLKGPSFPRDSAYFOASSPGSTOTQYFSGPTRLTVLEDIK NVPPPEVAVFEPSEAEISHIKATLVCLATGFYFHVELSWANNGKEVHSQVSTOPFLKEGPAND SRYQCLSSRIRVSATFWQNPRIHFRCOVOFGLESENDEATQDRAKPVTOVSAAWGRDCGF TSESYQCGVLSATLYELLGKATLYAVLVSALVUMAMYKRDSRG
148	R1IP303_... KE	beta	longitud completa		

{continuación}

SE Q ID No.	TCR	Cadena	Región	Secuencia
196	R11P203	alfa	COR288	M1.NK30E
197	R11P4C10	alfa	COR288	WNSGD
198	R11P1E8	alfa	COR288	TYSSGN
199	R11P1A8	alfa	COR288	WNSGD
200	R11P1D7	alfa	COR288	QEAYKKQ
201	R11P4G3	alfa	COR288	WNSGD
202	R11P2B6	alfa	COR288	WNSGD
203	Ig4	alfa	COR288	WSSGQE
204	R11P2D3	alfa	COR288	M1.NK30E

ES 2 986 840 T3

Tabla 2: Secuencias peptídicas de la invención

Código del péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
PRAME-004	SLLQHLIGL	97
PRAME-004_A1	ALLQHLIGL	98
PRAME-004_A2	SALQHLIGL	99
PRAME-004_A3	SLAQHLIGL	100
PRAME-004_A4	SLLAHLIGL	101
PRAME-004_A5	SLLQALIGL	102
PRAME-004_A6	SLLQHAIGL	103
PRAME-004_A7	SLLQHLAGL	104
PRAME-004_A8	SLLQHLIAL	105
PRAME-004_A9	SLLQHLIGA	106
PRAME-004_T1	TLLQHLIGL	107
PRAME-004_T2	STLQHLIGL	108
PRAME-004_T3	SLTQHLIGL	109
PRAME-004_T4	SLLTHLIGL	110
PRAME-004_T5	SLLQTLIGL	111
PRAME-004_T6	SLLQHTIGL	112
PRAME-004_T7	SLLQHLTGL	113
PRAME-004_T8	SLLQHLITL	114
PRAME-004_T9	SLLQHLIGT	115
TMED9-001	SILQTLILV	116
CAT-001	SLIEHLQGL	117
DDX60L-001	SLIQHLEEI	118
LRRC70-001	SLLKNLIYL	119
PTPLB-001	SLLNHLPYL	120
HDAC5-001	SLLQHVLLL	121
VPS13B-002	SLLQKQIML	122
ZNF318-001	SLSQELVGV	123
CCDC51-001	SVLGALIGV	124
IFIT1-001	VLLHHHQIGL	125
NYESO1-001	SLLMWITQV	126
ACPL-001	LLLVHLIPV	139
HSPB3-001	IILRHLIEI	140
UNC7-001	KILLHHLIHI	141

ES 2 986 840 T3

SCYL2-001	KVLPHLIP	142
RPS2P8-001	SALVHLIPV	143
PCNXL3-003	NALVHLIEV	144
AQP6-001	VALGHLIGI	145
PCNX-001	NALVHLIEI	146
AQP6-002	WALGHLIGI	147
TRGV10-001	QALEHLIYI	148
NECAP1-001	ISLAHLILV	149
FBXW2-001	ETLDHLISL	150
ACCSL-001	ALLSHLICR	151
ACER1-001	KELRHLIEV	152
ADAMTS14-001	IALVHLIMV	153
ARHGAP17-001	CWLCHLIKL	154
ARSE-001	GKLTHLIPV	155
ATP-009	HLLMHLIGS	156
AUNI-001	TQLDHLIPG	157
C16orf96-001	QDLWHLIKL	158
CDC7-002	IAALKHLIPT	159
CDC7-003	IAALKHLILT	160
CHRNA1-001	LQLIHLINV	161
FASTKD5-001	SQLVHLIYV	162
FRYL-002	CLLPHLIQH	163
FTH1-001	MVLVHLIHS	164
HERC4-002	SDLFHHLIGV	165
HPS5-001	KLLFHLIQS	166
HPS5-002	KLLLHLIQS	167
HTR2C-001	SFLVHLIGL	168
IPM-001	YGLKHLISV	169
KIF16-001	SELPHLIGI	170
KLHL33-001	YALSHLIHA	171
LAMA3-001	TLLGHLISK	172
LOC100128170-001	SQLSHLIAM	173
MAP2K7-001	FFLVHLICM	174
MON2-003	VSLHHLINA	175
OR2AK2-001	IMLIHLIRL	176

OR2AK2-002	ITLIHLIRL	177
OR2B6-001	SELFHLIPL	178
OR2B6-002	SVLFHLIPL	179
OTUD7A-001	AQLAHLILS	180
OVOS2-001	FLLGHLIPR	181
PIGC-002	MLLGHLIFF	182
RAD54L2-003	VLLFHЛИЕ	183
RASEF-001	VFLRHЛITL	184
RASGRF1-003	TLLDHLIFK	185
RPS2P20-001	SVLVHLIPA	186
SACS-001	AKLEHLIYL	187
SPATA31D5-001	LLPHLILS	188
TPST2-001	SILGHLICS	189
TRGV10-002	QSLEHLIYI	190
UGP-001	YILNHLINP	191
USP51-001	YKLLHLIWI	192
NF423-002	NF423-002	193
ZNF584-001	ALLDHLITH	194
ZNF99-001	FMLSHLIQH	195

Ejemplos

Siete TCRs específicos para PRAME dirigidos al péptido PRAME-004 divulgado en la presente (R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3 y R17P2B6, véase la Tabla 1), cada uno codificando

5 para cadenas alfa TCR y beta TCR específicas de tumor, fueron aislados y amplificados a partir de células T de donadores sanos. Las células de donadores sanos se estimularon *in vitro* de acuerdo con un método descrito previamente (Walter et al., 2003 J Immunol., Nov 15;171(10):4974-8) y las células específicas para la diana se clasificaron unicelularmente utilizando multímeros HLA-A*02 y luego se utilizaron para el posterior aislamiento del TCR. Las secuencias del TCR se aislaron mediante 5' RACE utilizando métodos estándar, como se describe

10 en, por ejemplo, Molecular Cloning a laboratory manual fourth edition by Green and Sambrook. Se secuencianon y clonaron las regiones variables alfa y beta de los TCRs R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3 y R17P2B6 para su posterior caracterización funcional.

R11P3D3, R16P1C10, R17P1D7 y R17P2B6 se derivan de un donador HLA-A*02 negativo (configuración alorreactiva) y R16P1E8, R17P1A9 y R17P1G3 se derivan de un donador HLA-A*02 positivo.

15 Adicionalmente, en la presente se divulga el TCR mutante R11P3D3_KE, una variante mejorada de R11P3D3. La variante del TCR mejorada R11P3D3_KE se modificó a partir del TCR parental como se describe en PCT/EP2017/081745, y en el ejemplo 8 a continuación, y la secuencia codificante se obtuvo mediante síntesis de genes antes de la caracterización funcional del TCR.

Ejemplo 1: Receptor de células T R11P3D3

20 El TCR R11P3D3 (SEQ ID NO:1-12 y 196) está restringido hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97) (véase la Figura 8).

R11P3D3 reconoce específicamente a PRAME-004, ya que las células T CD8+ primarias humanas que reexpresan este TCR liberan IFNy tras la coincubación con las células diana HLA-A*02+, cargadas con el péptido PRAME-004 o variantes de sustitución de alanina o treonina de PRAME-004 (Figura 1) o diferentes péptidos que muestran un alto grado de similitud de secuencia con PRAME-004 (Figura 8). El péptido NYESO1-

001 se utiliza como control negativo. El TCR R11P3D3 tiene una EC50 de 0.74 nM (Figura 15) y una afinidad de unión (K_D) de 18 - 26 μ M hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97).

La reexpresión de R11P3D3 en células T CD8+ primarias humanas conduce al reconocimiento selectivo y la eliminación de líneas celulares tumorales presentadoras de HLA-A*02/PRAME-004 (Figuras 24, 25, 30 y 32).

- 5 El TCR R11P3D3 no responde a ninguno de los 25 tipos de células sanas, primarias o derivadas de iPSC analizadas (Figuras 24 y 25) y se analizó la reactividad cruzada frente a otros 67 péptidos similares (de los cuales 57 eran idénticos a PRAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados en el contexto de HLA-A*02 (Figuras 8, 22 y 23).

Ejemplo 2: Receptor de células T R16P1C10

- 10 El TCR R16P1 C10 (SEQ ID NO:13-24 y 197) está restringido hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97) (véase la Figura 9).

R16P1C10 reconoce específicamente a PRAME-004, ya que las células T CD8+ primarias humanas que reexpresan este TCR liberan IFNy tras la coincubación con células diana HLA-A*02+ y se unen a tetrámeros HLA-A*02 (Figura 21), respectivamente, cargados con ya sea el péptido PRAME-004 o variantes de sustitución de alanina o treonina de PRAME-004 (Figura 2) o diferentes péptidos que muestran un alto grado de similitud de secuencia con PRAME-004 (Figura 9). El péptido NYESO1-001 se utiliza como control negativo. El TCR R16P1C10 tiene una EC50 de 9.6nM (Figura 16).

Ejemplo 3: Receptor de células T R16P1E8

- 20 El TCR R16P1E8 (SEQ ID NO:25-36 y 198) está restringido hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97) (véase la Figura 10).

R16P1E8 reconoce específicamente a PRAME-004, ya que las células T CD8+ primarias humanas que reexpresan este TCR liberan IFNy tras la coincubación con células diana HLA-A*02+, cargadas con ya sea el péptido PRAME-004 o las variantes de sustitución de alanina o treonina de PRAME-004 (Figura 3) o diferentes péptidos que muestran un alto grado de similitud de secuencia con PRAME-004 (Figura 10). El péptido NYESO1-001 se utiliza como control negativo. El TCR R16P1E8 tiene una EC50 de ~1 μ M (Figura 17).

Ejemplo 4: Receptor de células T R17P1A9

El TCR R17P1A9 (SEQ ID NO:37-48 y 199) está restringido hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97) (véase la Figura 11).

- 30 R17P1A9 reconoce específicamente a PRAME-004, ya que las células T CD8+ primarias humanas que reexpresan este TCR liberan IFNy tras la coincubación con células diana HLA-A*02+, cargadas con ya sea el péptido PRAME-004 o las variantes de sustitución de alanina de PRAME-004 (Figura 4) o diferentes péptidos que muestran un alto grado de similitud de secuencia con PRAME-004 (Figura 11). El péptido NYESO1-001 se utiliza como control negativo.

Ejemplo 5: Receptor de células T R17P1 D7

- 35 El TCR R17P1D7 (SEQ ID NO:49-60 y 200) está restringido hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97) (véase la Figura 12).

R17P1D7 reconoce específicamente a PRAME-004, ya que las células T CD8+ primarias humanas que reexpresan este TCR liberan IFNy tras la coincubación con células diana HLA-A*02+, cargadas con ya sea el péptido PRAME-004 o las variantes de sustitución de alanina o treonina de PRAME-004 (Figura 5) o diferentes péptidos que muestran un alto grado de similitud de secuencia con PRAME-004 (Figura 12). El péptido NYESO1-001 se utiliza como control negativo. El TCR R17P1 D7 tiene una EC50 de 1.83 nM (Figura 18).

Ejemplo 6: Receptor de células T R17P1G3

El TCR R17P1G3 (SEQ ID NO:61-72 y 201) está restringido hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97) (véase la Figura 13).

- 45 R17P1G3 reconoce específicamente a PRAME-004, ya que las células T CD8+ primarias humanas que reexpresan este TCR liberan IFNy tras la coincubación con células diana HLA-A*02+, cargadas con ya sea el péptido PRAME-004 o las variantes de sustitución de alanina o treonina de PRAME-004 (Figura 6) o diferentes péptidos que muestran un alto grado de similitud de secuencia con PRAME-004 (Figura 13). El péptido NYESO1-001 se utiliza como control negativo. El TCR R17P1G3 tiene una EC50 de 8.63 nM (Figura 19).

- 50 **Ejemplo 7: Receptor de células T R17P2B6**

El TCR R17P2B6 (SEQ ID NO:73-84 y 202) está restringido hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID NO:97) (véase la Figura 14).

R17P2B6 reconoce específicamente a PRAME-004, ya que las células T CD8+ primarias humanas que reexpresan este TCR liberan IFNy tras la coincubación con células diana HLA-A*02+, cargadas con el péptido PRAME-004 o las variantes de sustitución de alanina o treonina de PRAME-004 (Figura 7) o diferentes péptidos que muestran un alto grado de similitud de secuencia con PRAME-004 (Figura 14). El péptido NYESO1-001 se utiliza como control negativo. El TCR R17P2B6 tiene una EC50 de 2.11 nM (Figura 20) y una afinidad de unión (K_D) de 13 μ M hacia PRAME-004 presentado por HLA-A*02.

Ejemplo 8: Receptor de células T mejorado R11P3D3 KE

El TCR mutado de "emparejamiento mejorado" R11P3D3 KE se presenta como una variante de R11P3D3, donde los dominios variables α y β , que naturalmente llevan α W44/ β Q44, se han mutado a α K44/ β E44. La doble mutación se selecciona entre la lista presente en PCT/EP2017/081745. Está específicamente diseñado para restablecer una interacción óptima y la complementariedad de forma con el andamio del TCR.

Comparado con el TCR parental R11P3D3, el TCR mejorado R11P3D3 KE muestra una sensibilidad superior por el reconocimiento de PRAME-004. La respuesta hacia las líneas celulares tumorales que presentan PRAME-004 es más fuerte con el TCR mejorado R11P3D3 KE en comparación con el TCR parental R11P3D3 (Figura 30). Además, la actividad citolítica de R11P3D3 KE es mayor que la de R11P3D3 (Figura 32). La respuesta funcional mejorada observada del TCR mejorado R11P3D3 KE concuerda bien con una mayor afinidad de unión hacia PRAME-004, como se describe en el ejemplo 1 (R11P3D3, K_D =18-26 μ M) y en el ejemplo 8 (R11P3D3 KE, K_D =5.3 μ M).

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de reconocimiento del antígeno que comprende seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) 1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 7, 8 y 9.
- 5 2. La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha construcción de reconocimiento del antígeno es capaz de unirse específicamente al péptido antigénico Antígeno Preferencialmente Expresado del Melanoma (PRAME) como se muestra en SEQ ID NO: 97.
3. La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la construcción de reconocimiento del antígeno es un receptor de células T (TCR) o un fragmento del mismo.
- 10 4. La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una cadena α o γ del TCR; y una cadena β o δ del TCR; en la que la cadena α o γ del TCR y la cadena β o δ del TCR comprenden las secuencias como se define en la reivindicación 1.
- 5 5. La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una región de cadena variable del TCR que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 4, 10, 130 y 136.
- 15 6. La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un fragmento de unión de un TCR, y en la que dicho fragmento de unión comprende CDR1 a CDR3 seleccionadas de las secuencias CDR1 a CDR3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1, 2, 3; o 7, 8, 9.
- 20 7. La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el TCR es un TCR de cadena sencilla (scTCR).
8. Un ácido nucleico que codifica para la construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
- 25 10. Una célula hospedera que comprende la construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o el vector de acuerdo con la reivindicación 9, preferiblemente en la que la célula hospedera es un linfocito, más preferiblemente un linfocito T o un progenitor de linfocito T, más preferiblemente una célula T CD4 o CD8 positiva.
- 30 11. Una composición farmacéutica que comprende la construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o el vector de acuerdo con la reivindicación 9, o la célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 10, y un portador, estabilizador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. La construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o el vector de acuerdo con la reivindicación 9, o la célula hospedera de acuerdo con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en medicina, preferiblemente para uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad proliferativa.
13. Un método de fabricación de una línea celular que expresa una construcción de reconocimiento del antígeno específico del antígeno asociado a tumor (TAA), que comprende
- 40 a. proporcionar una célula hospedera adecuada,
- b. proporcionar una construcción genética que comprende una secuencia codificante que codifica para la construcción de reconocimiento del antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,
- c. introducir en dicha célula hospedera adecuada dicha construcción genética, y
- d. expresar dicha construcción genética mediante dicha célula hospedera adecuada,
- 45 e. aislar y purificar la construcción de reconocimiento del antígeno a partir de la célula hospedera adecuada y, opcionalmente,
- f. reconstituir la construcción de reconocimiento del antígeno en una célula T.

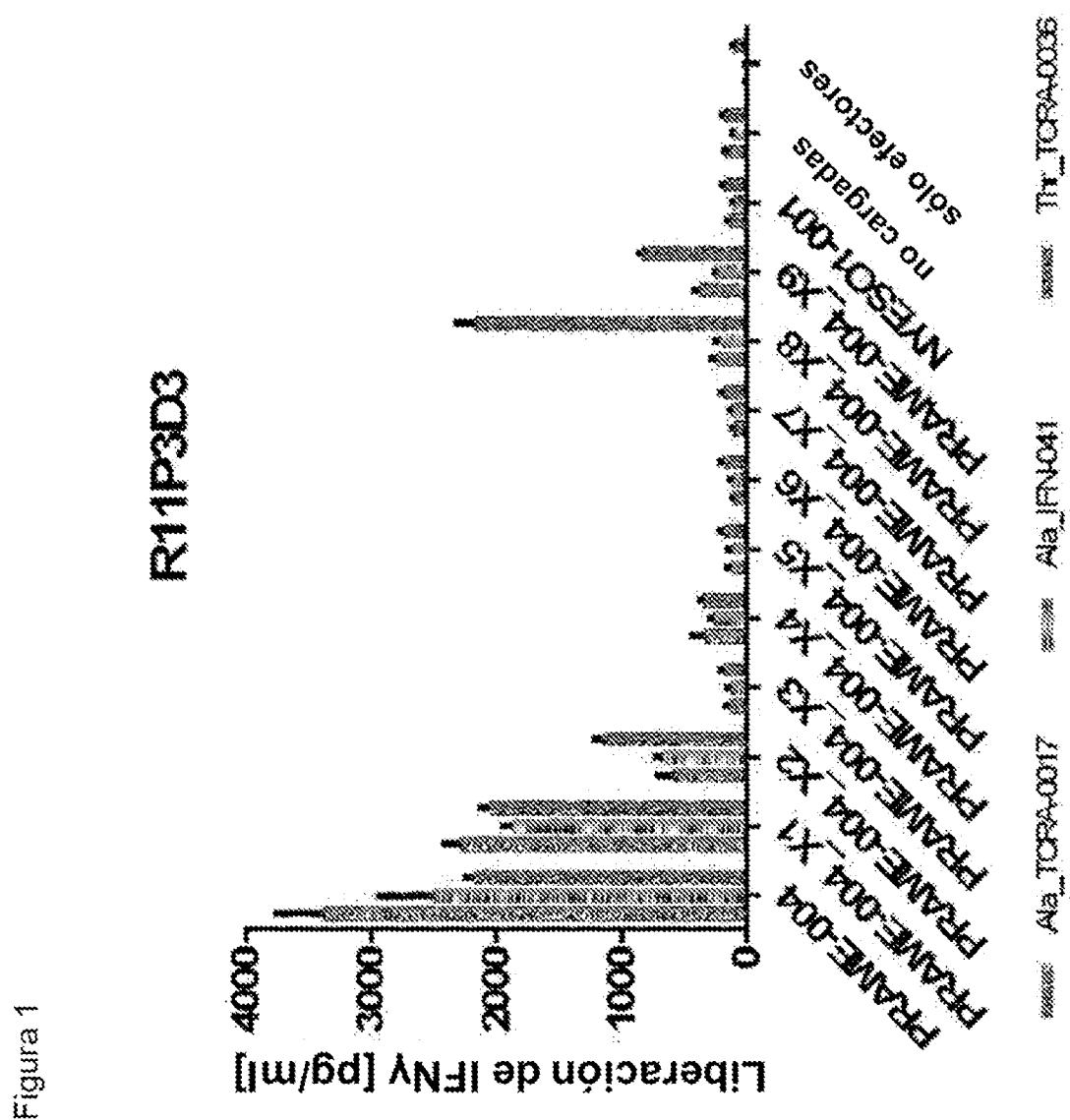


Figura 2

R16P1C10

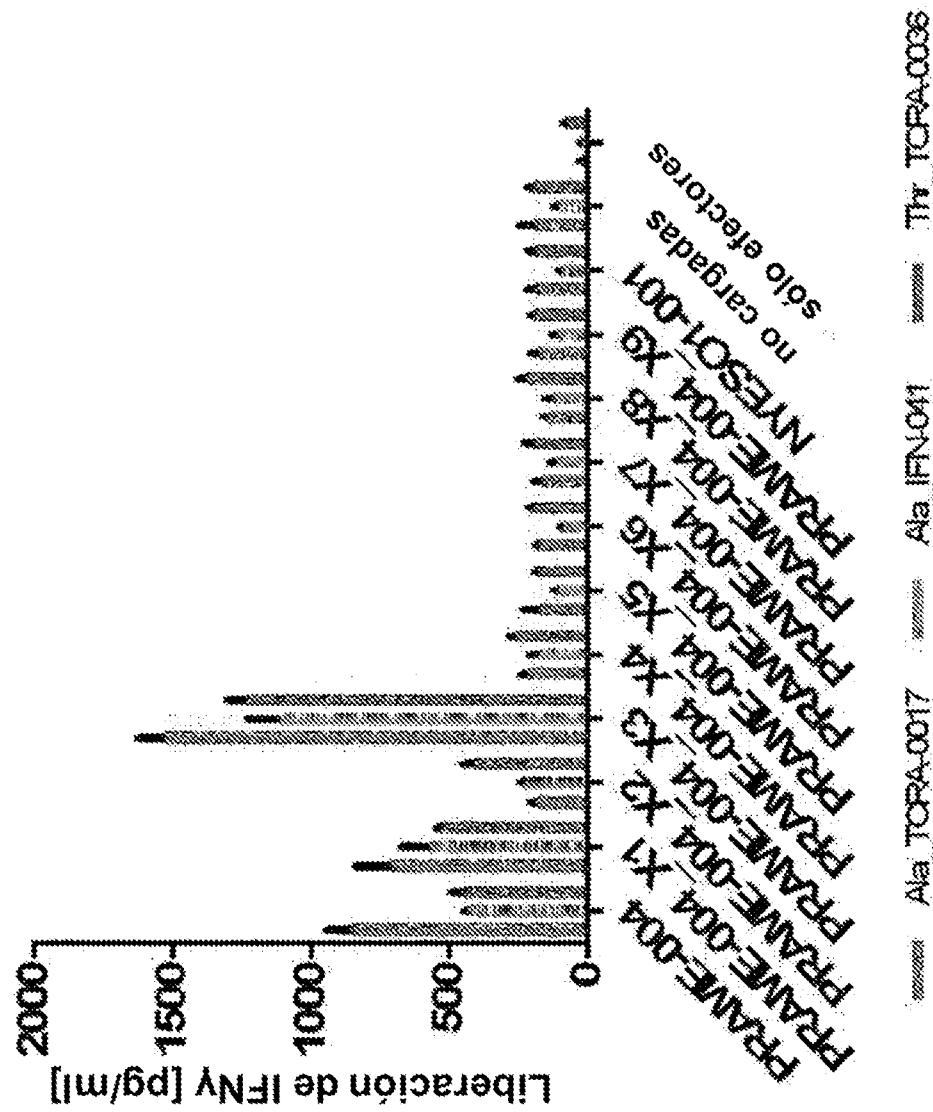
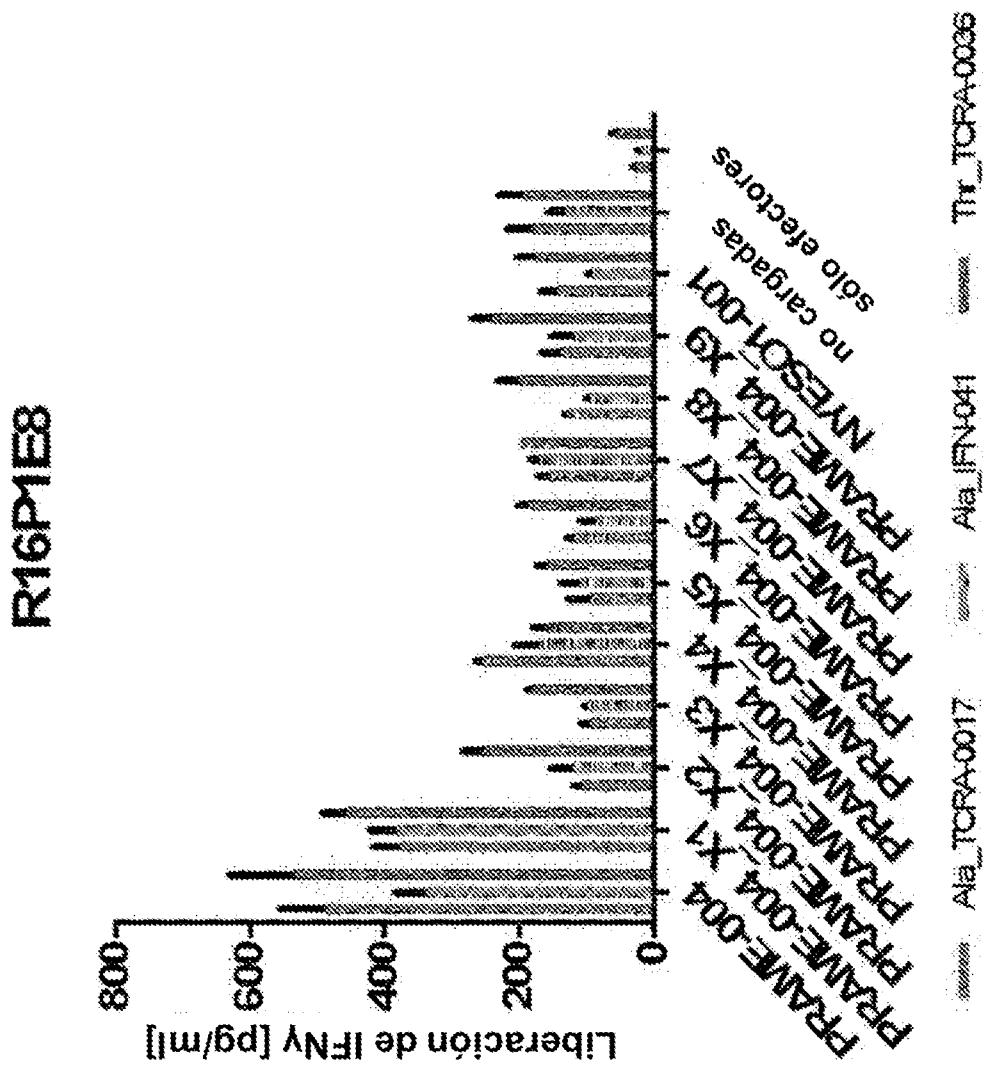
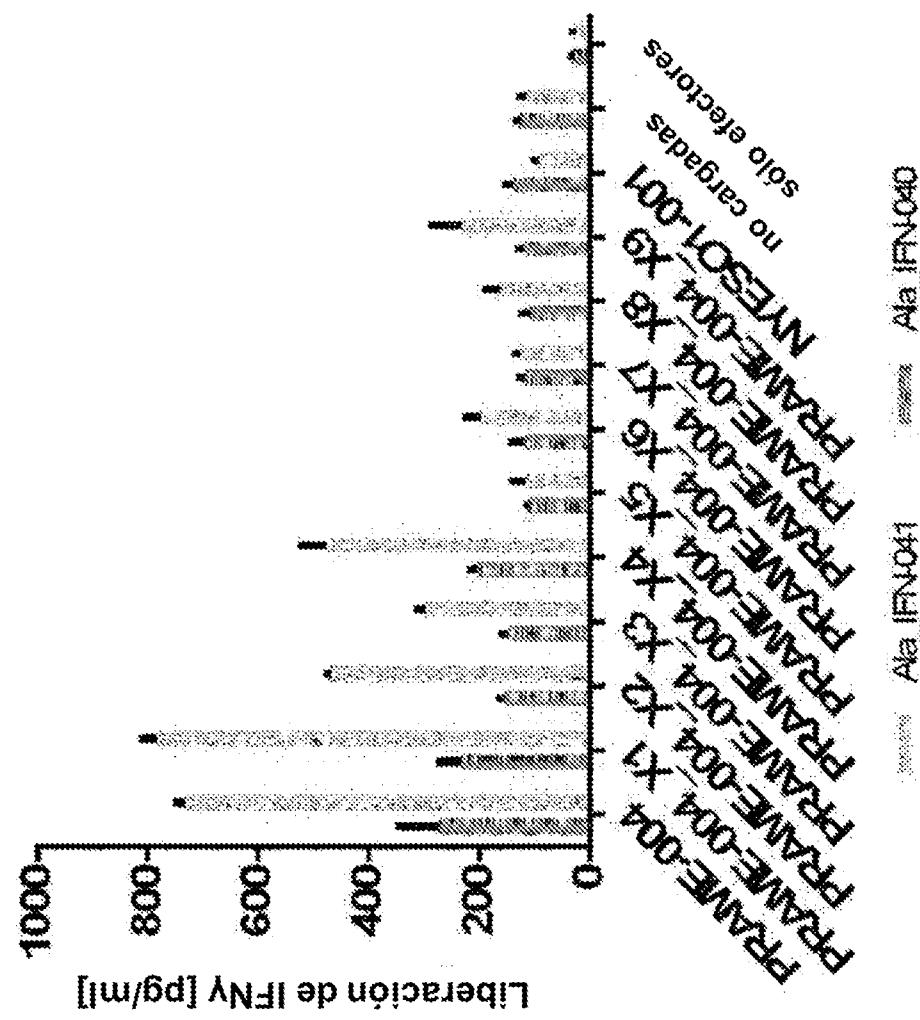


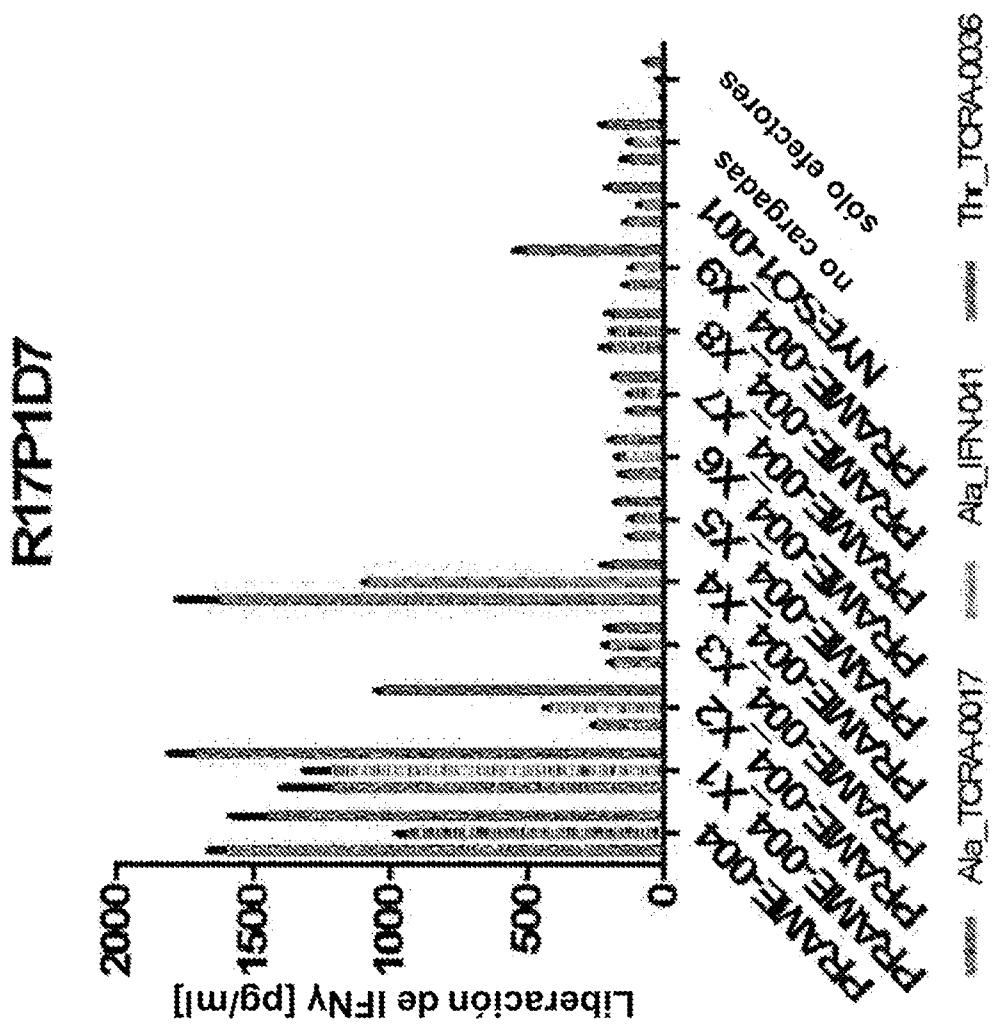
Figure 3



R17P1A9

Figura 4





5

Figura 6

R17P1G3

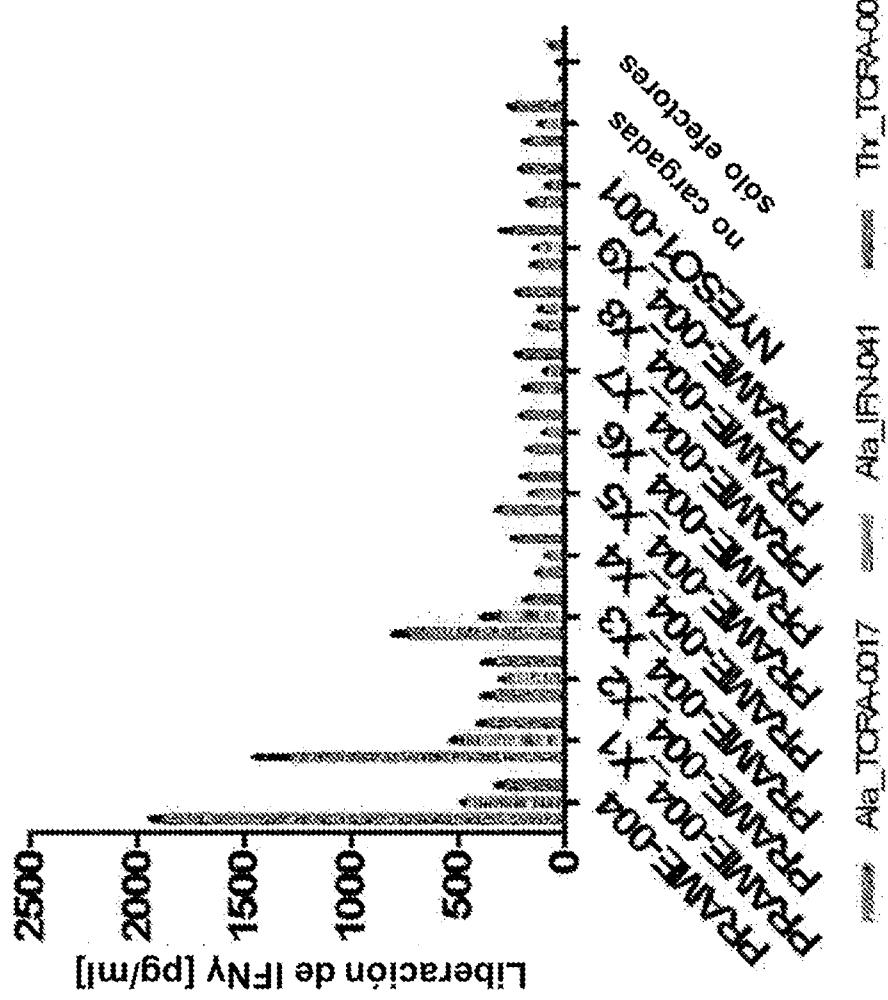


Figura 7

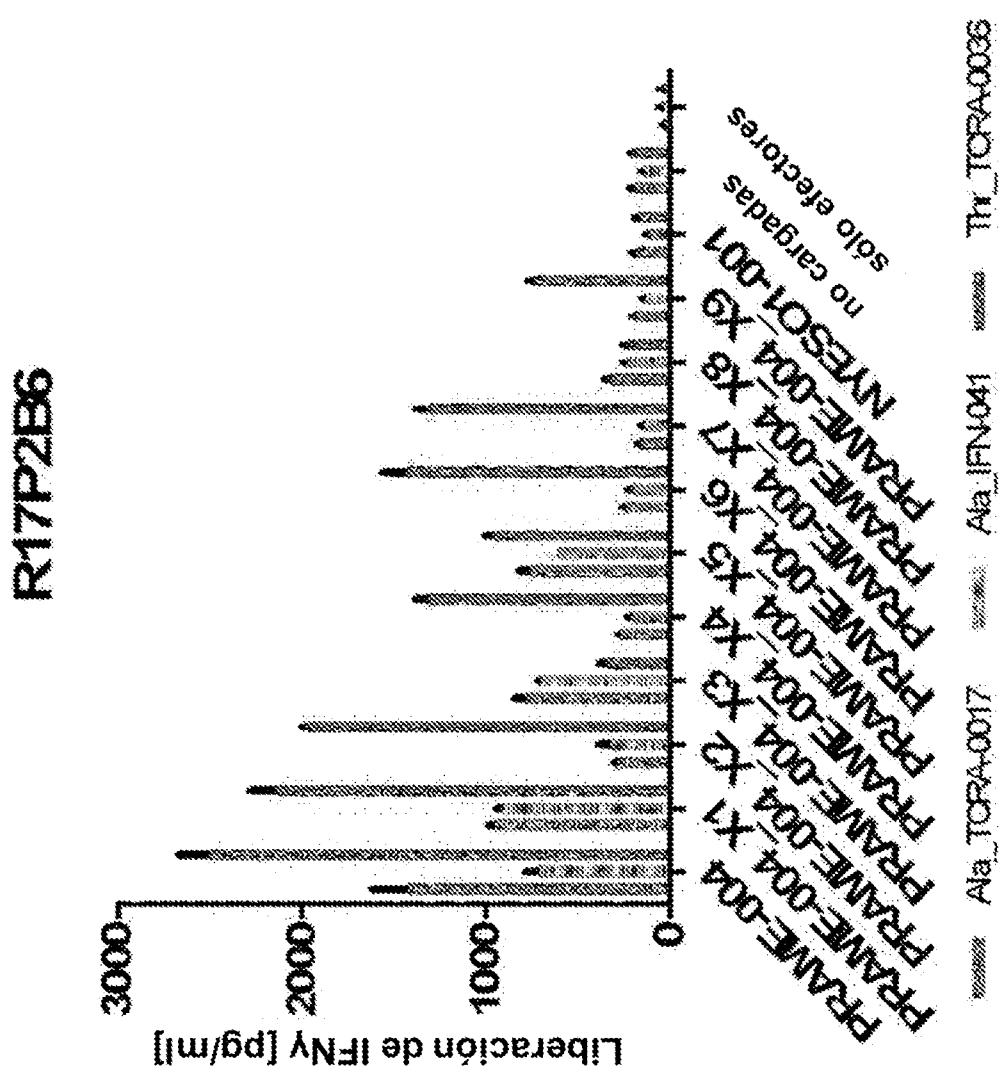


Figura 8

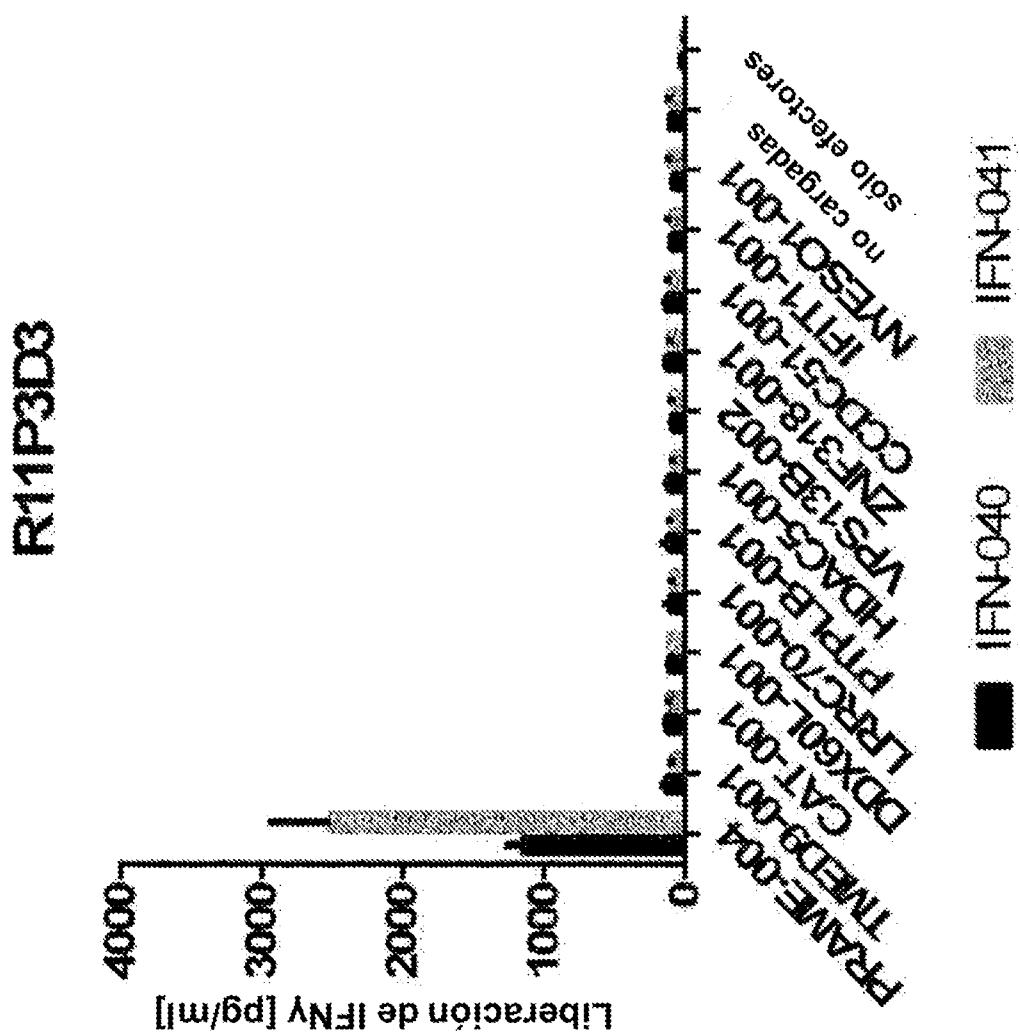
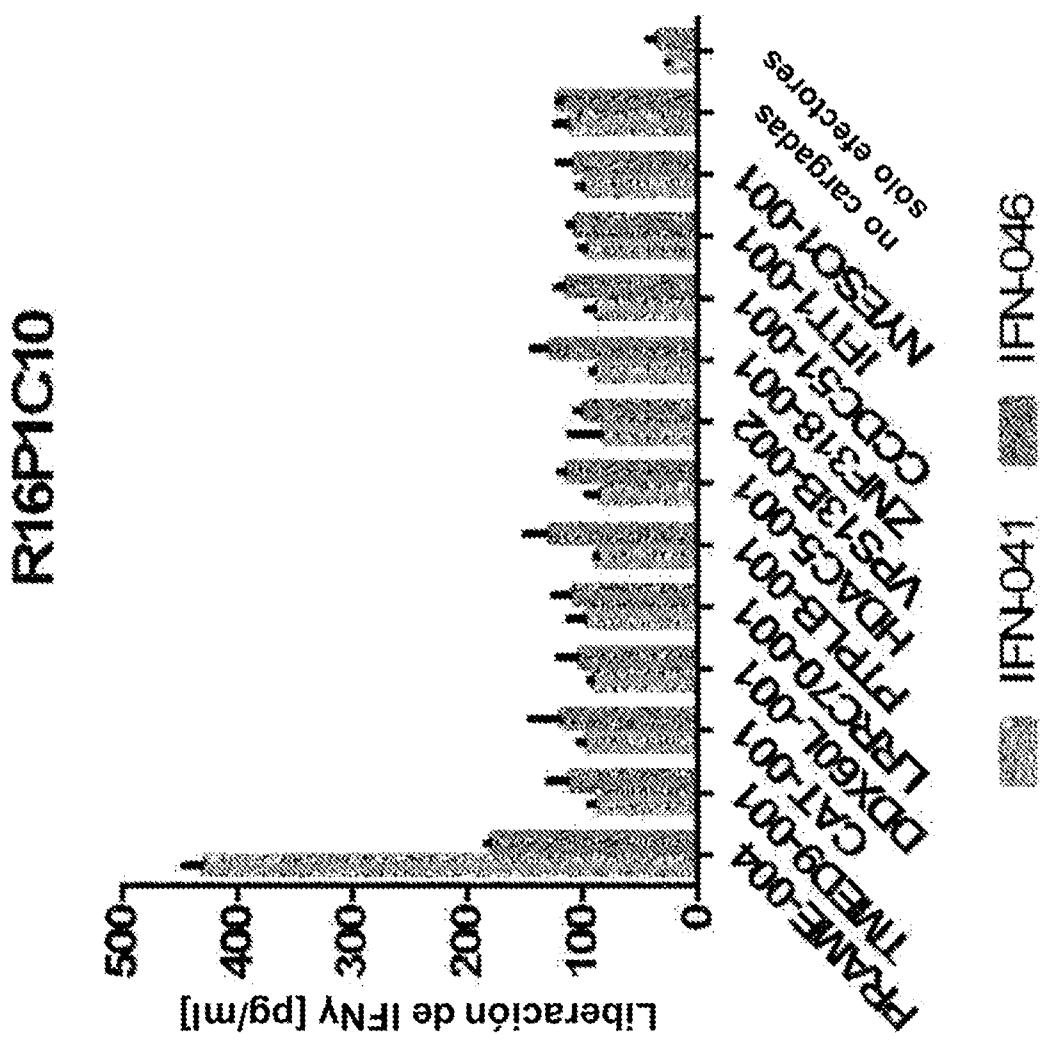


Figura 9



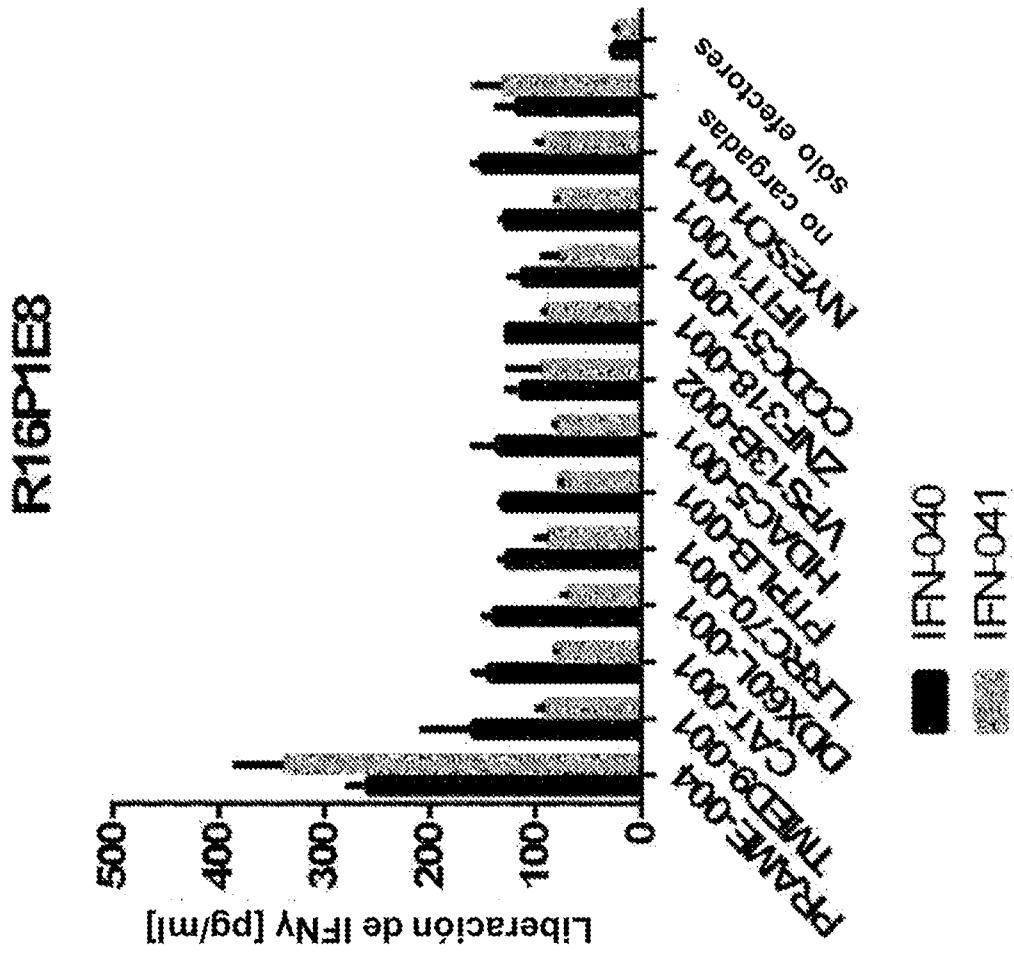


Figura 10

Figura 11

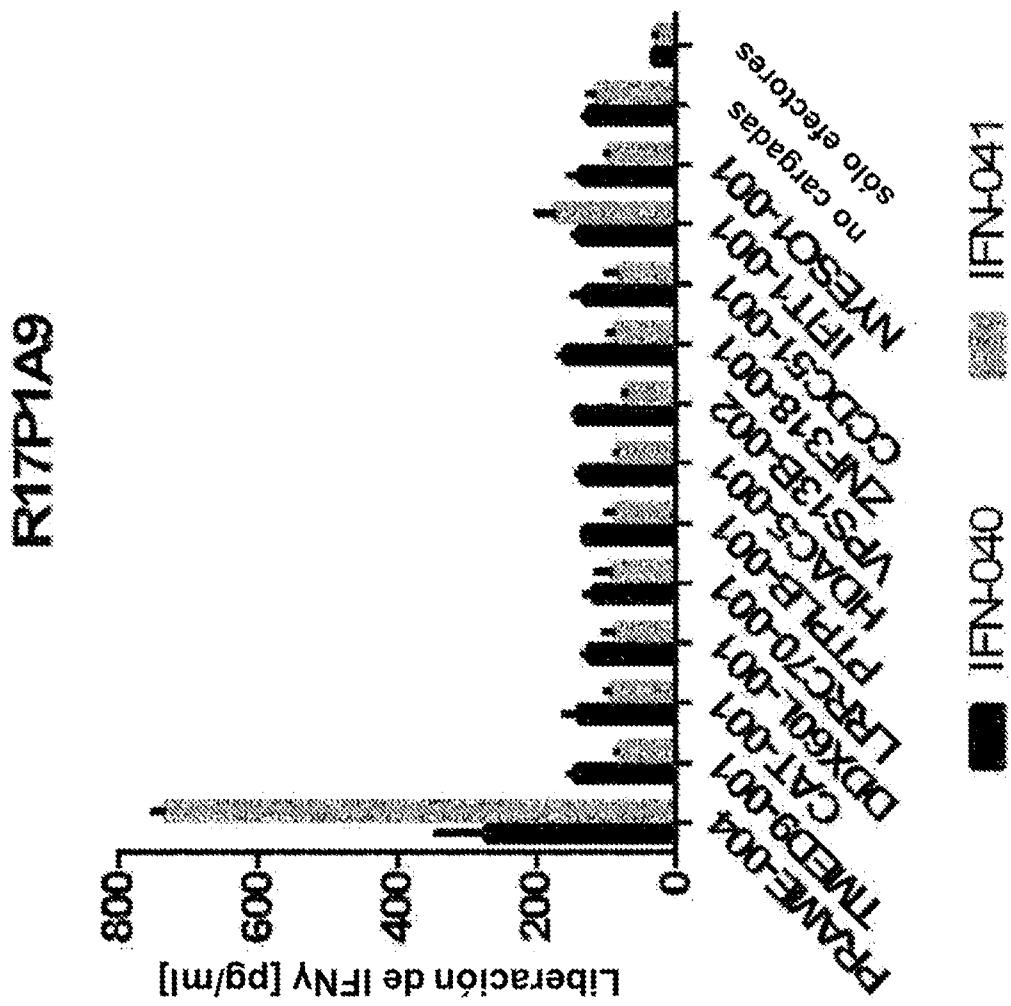


Figura 12

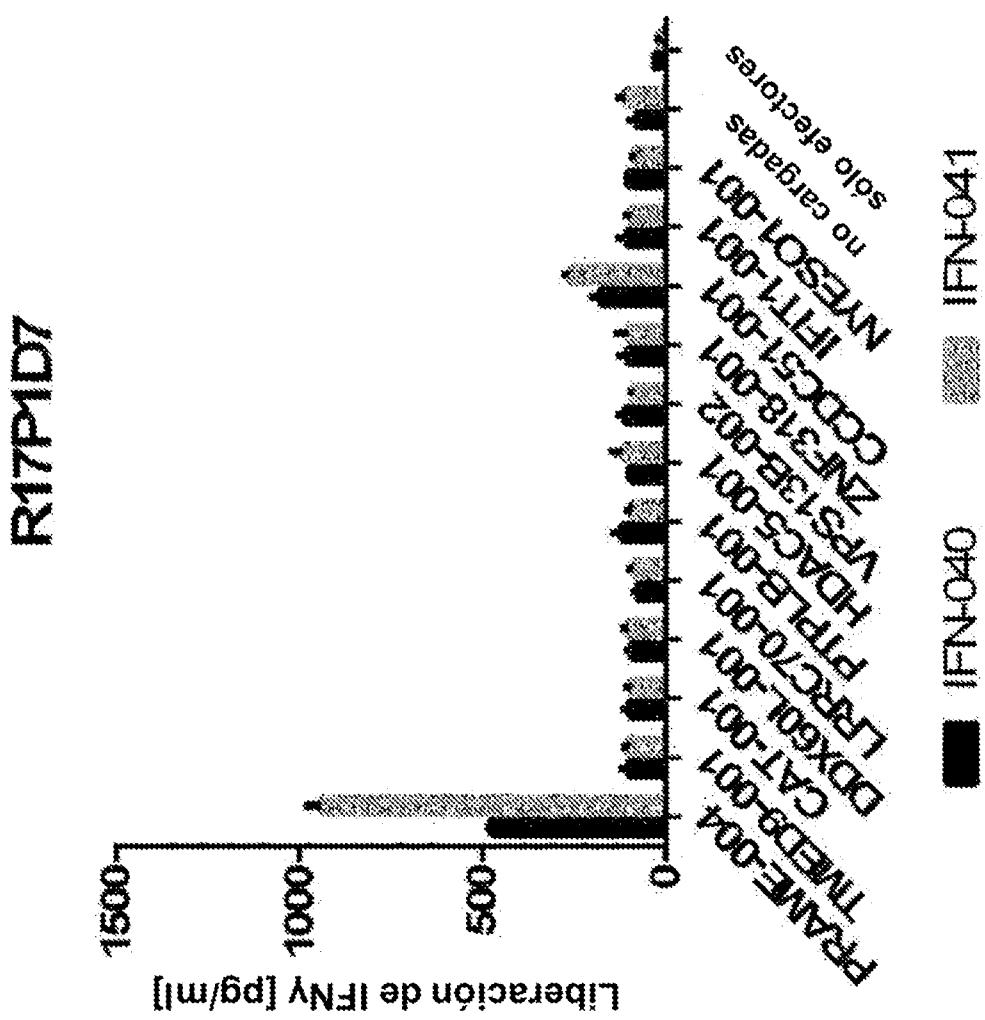


Figura 13

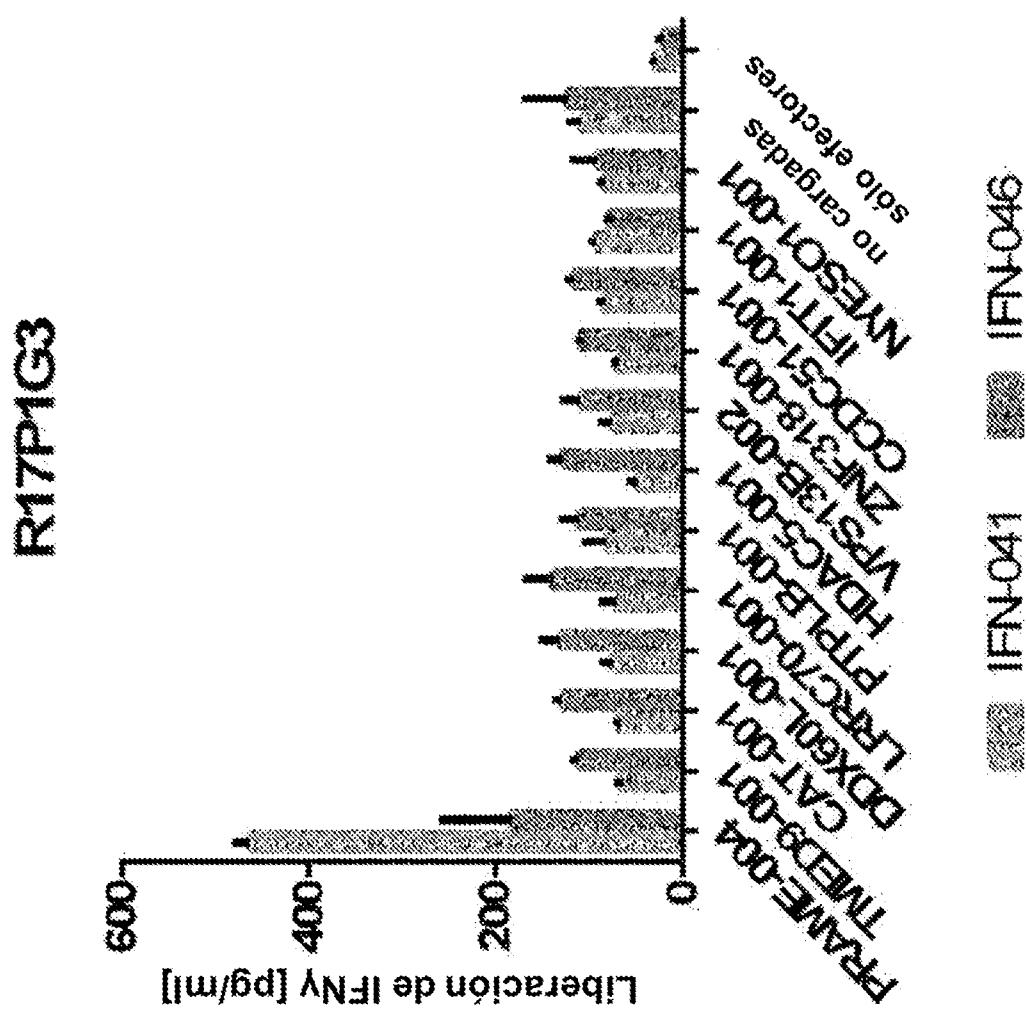


Figura 14

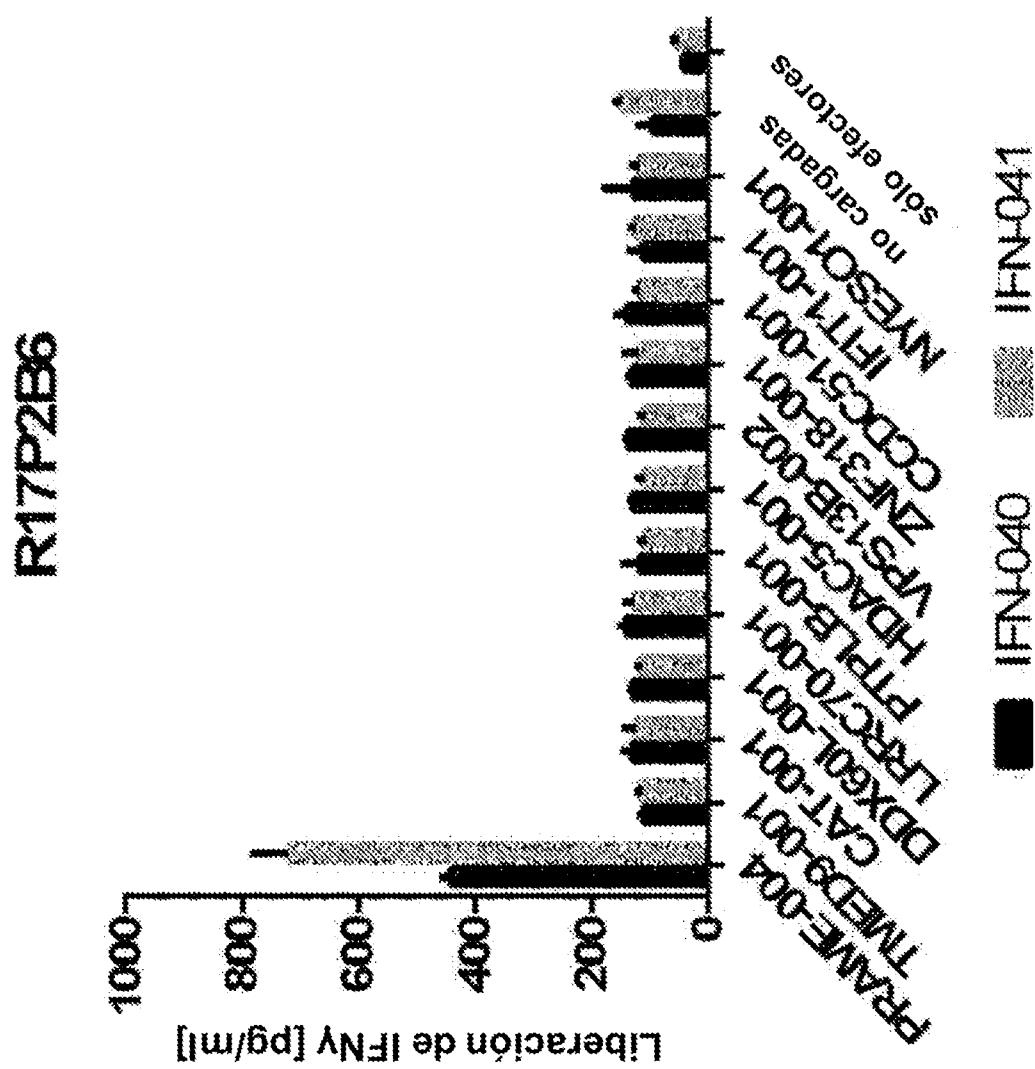


Figura 15

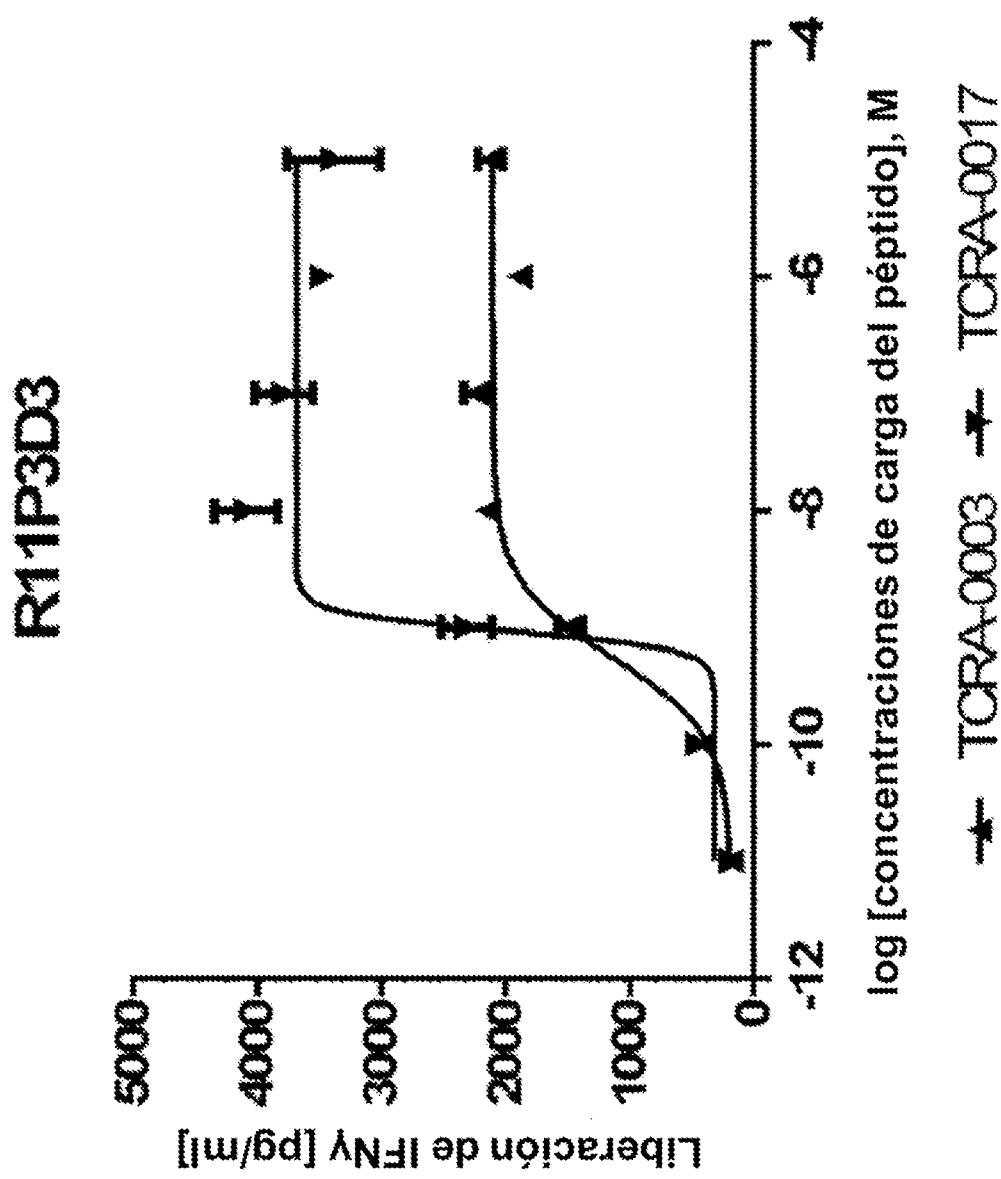


Figura 16

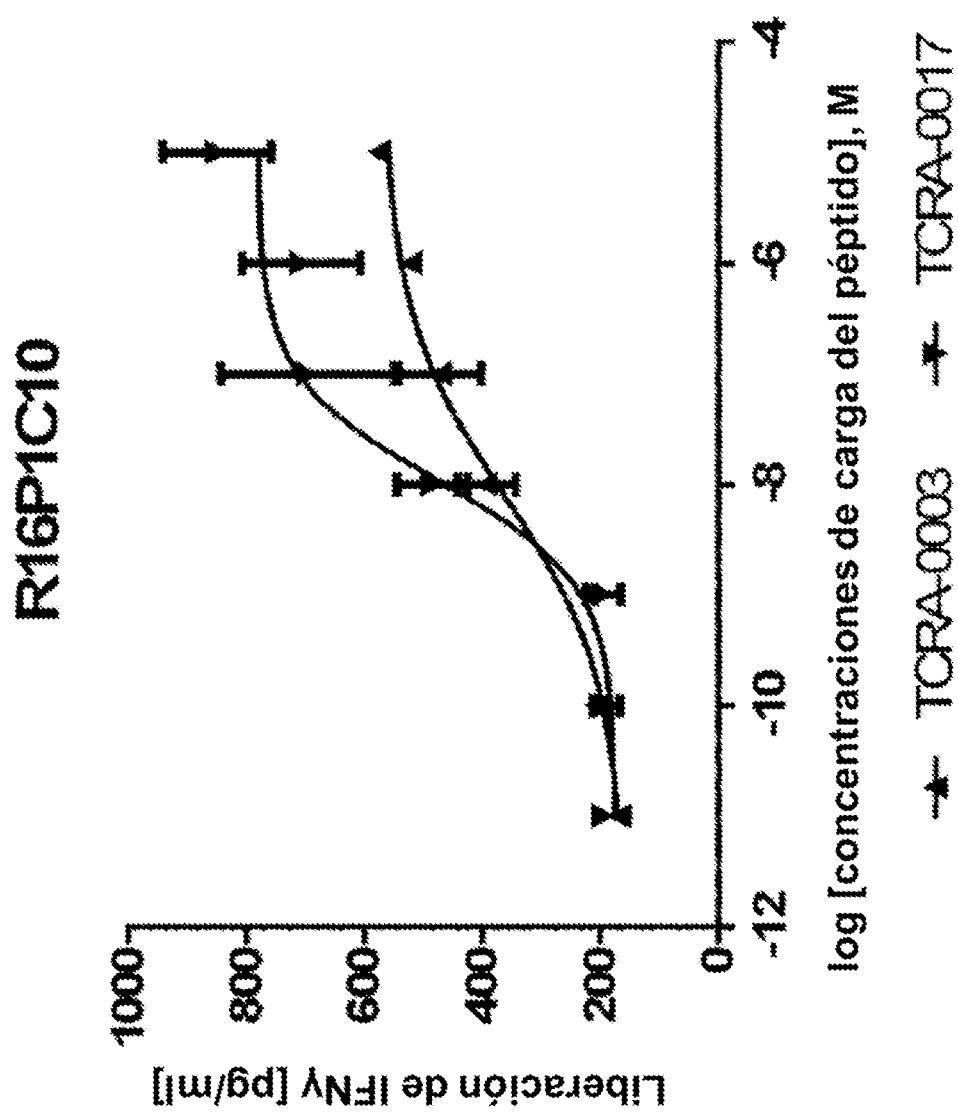


Figura 17

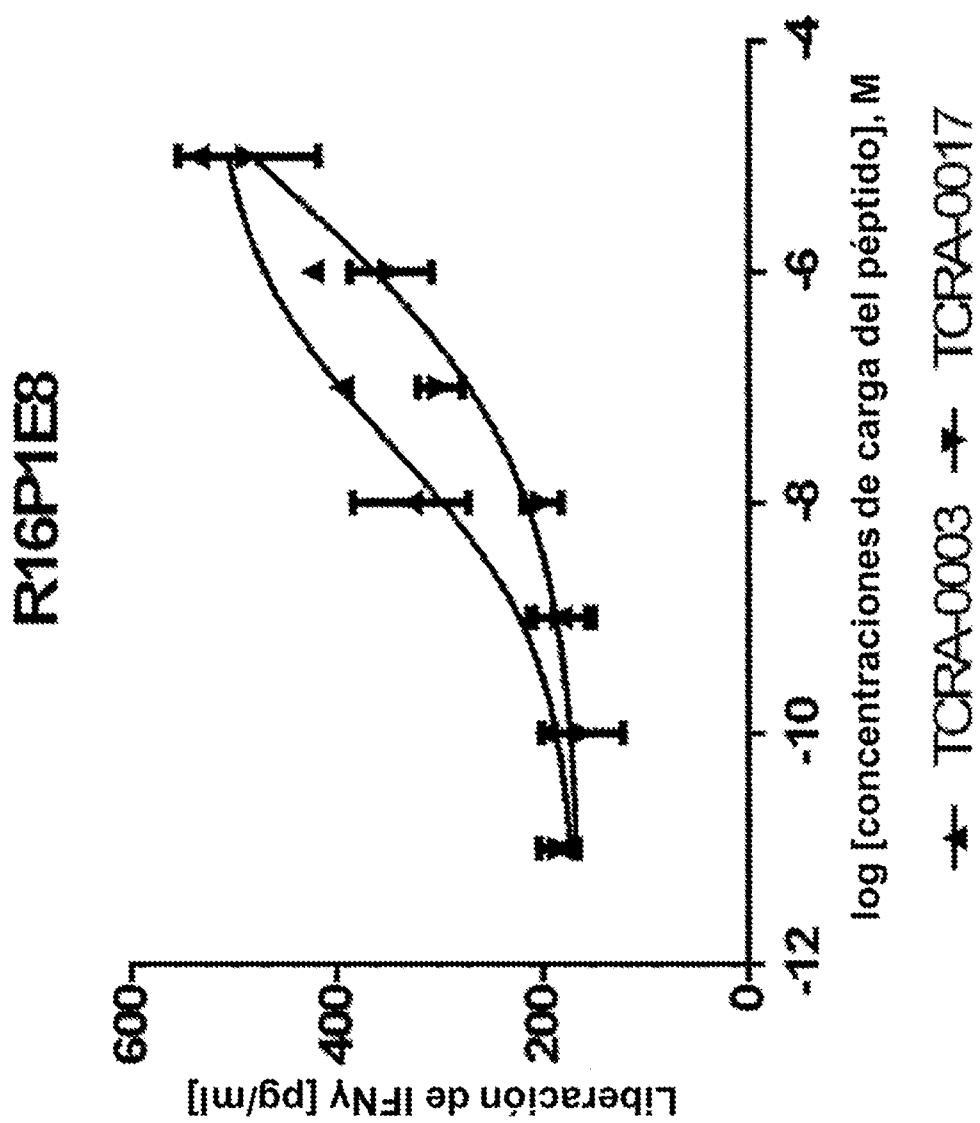


Figura 18

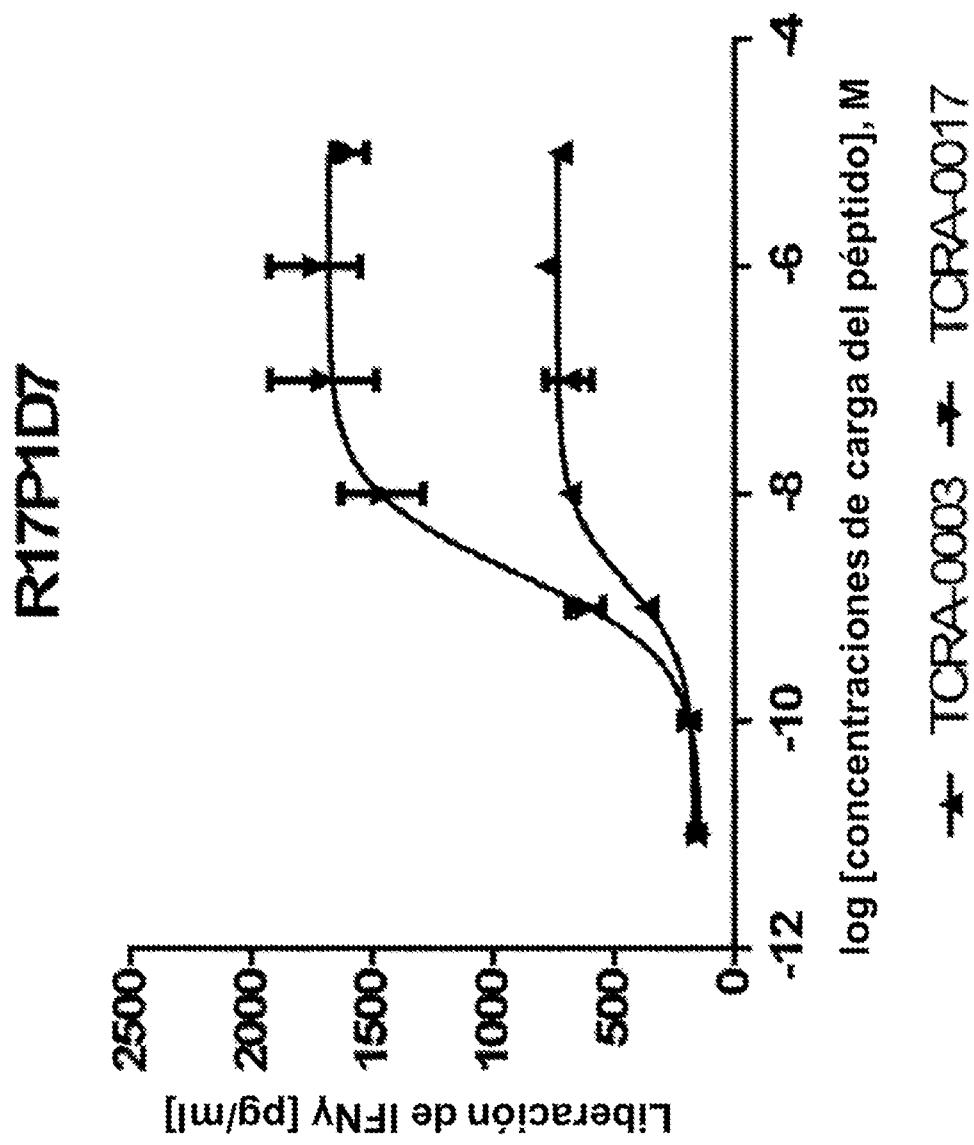


Figura 19

R17P1G3

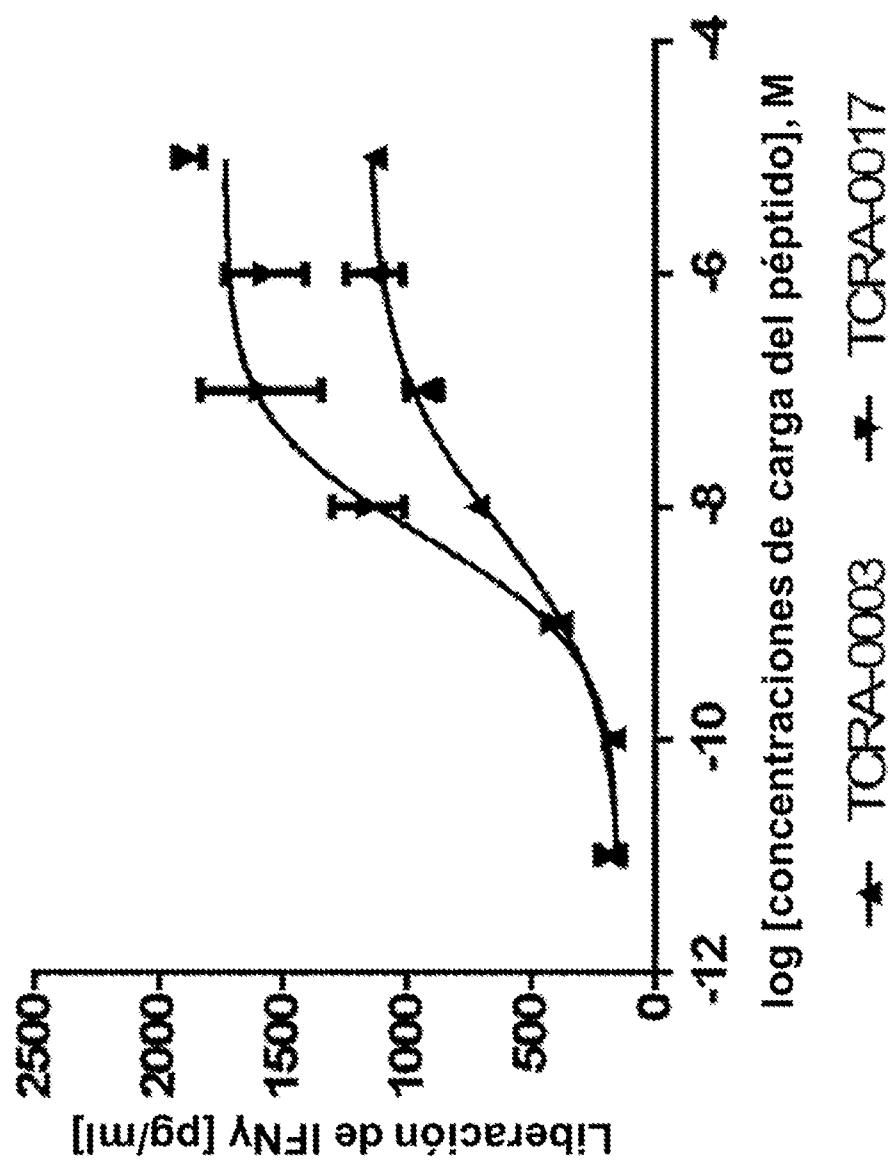


Figura 20

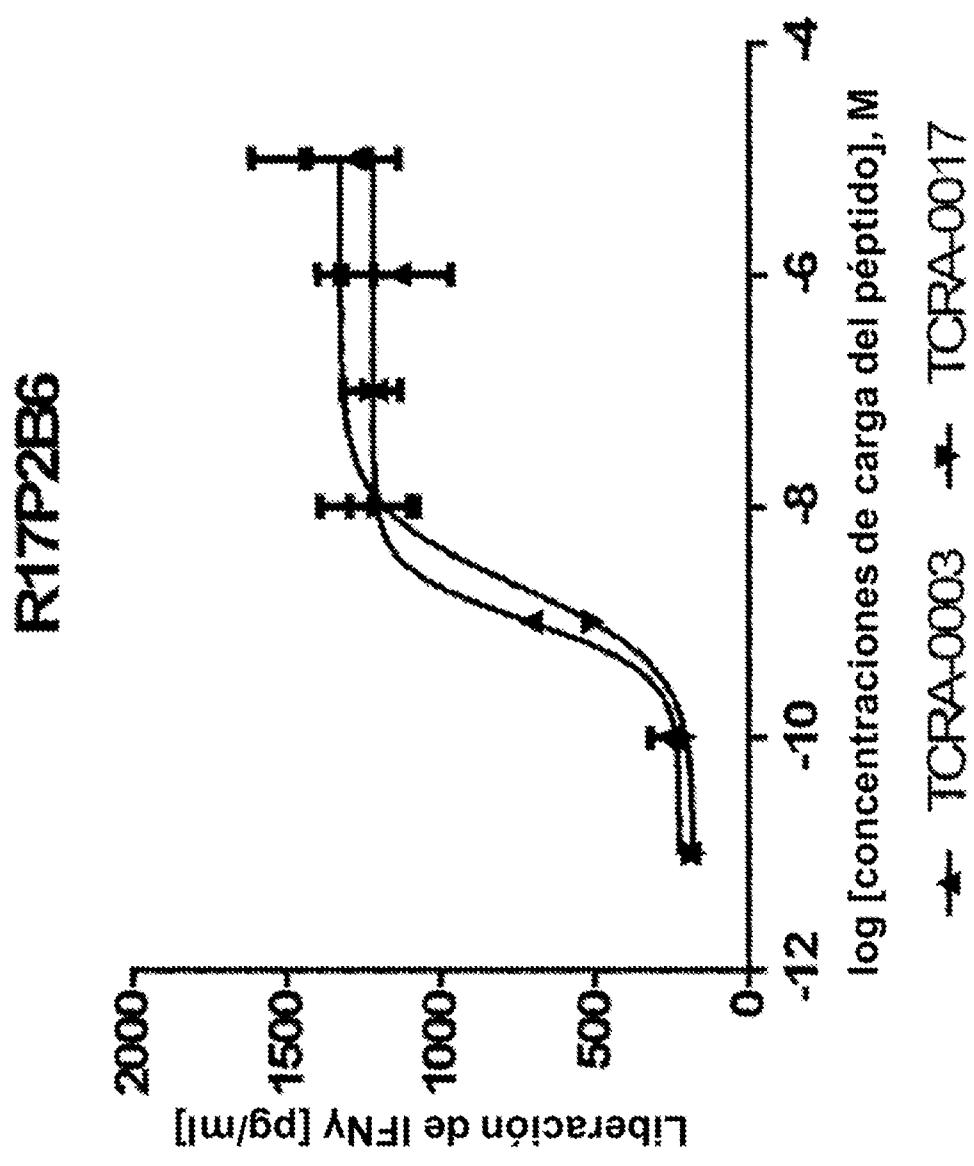


Figura 21

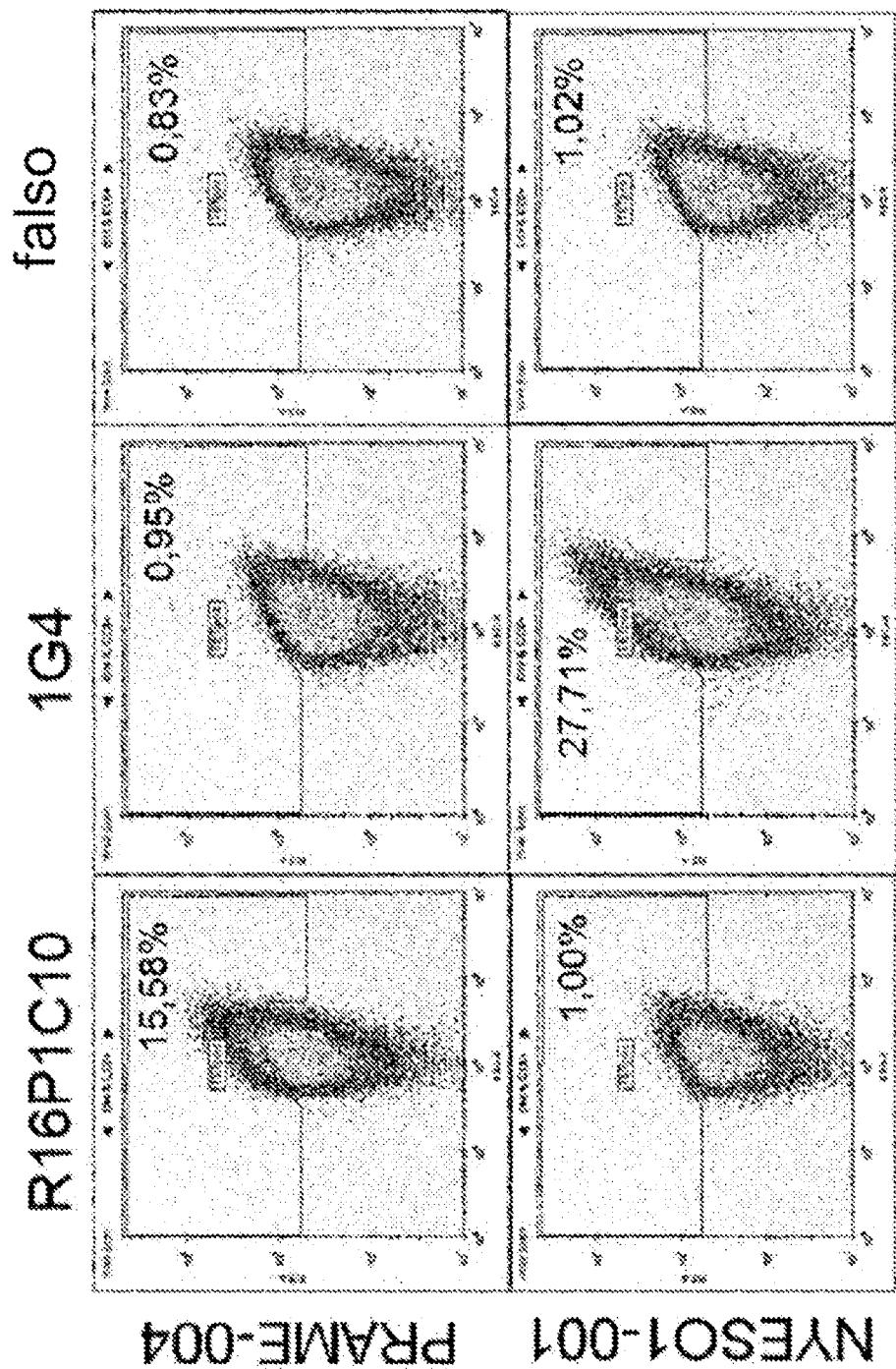


Figura 22

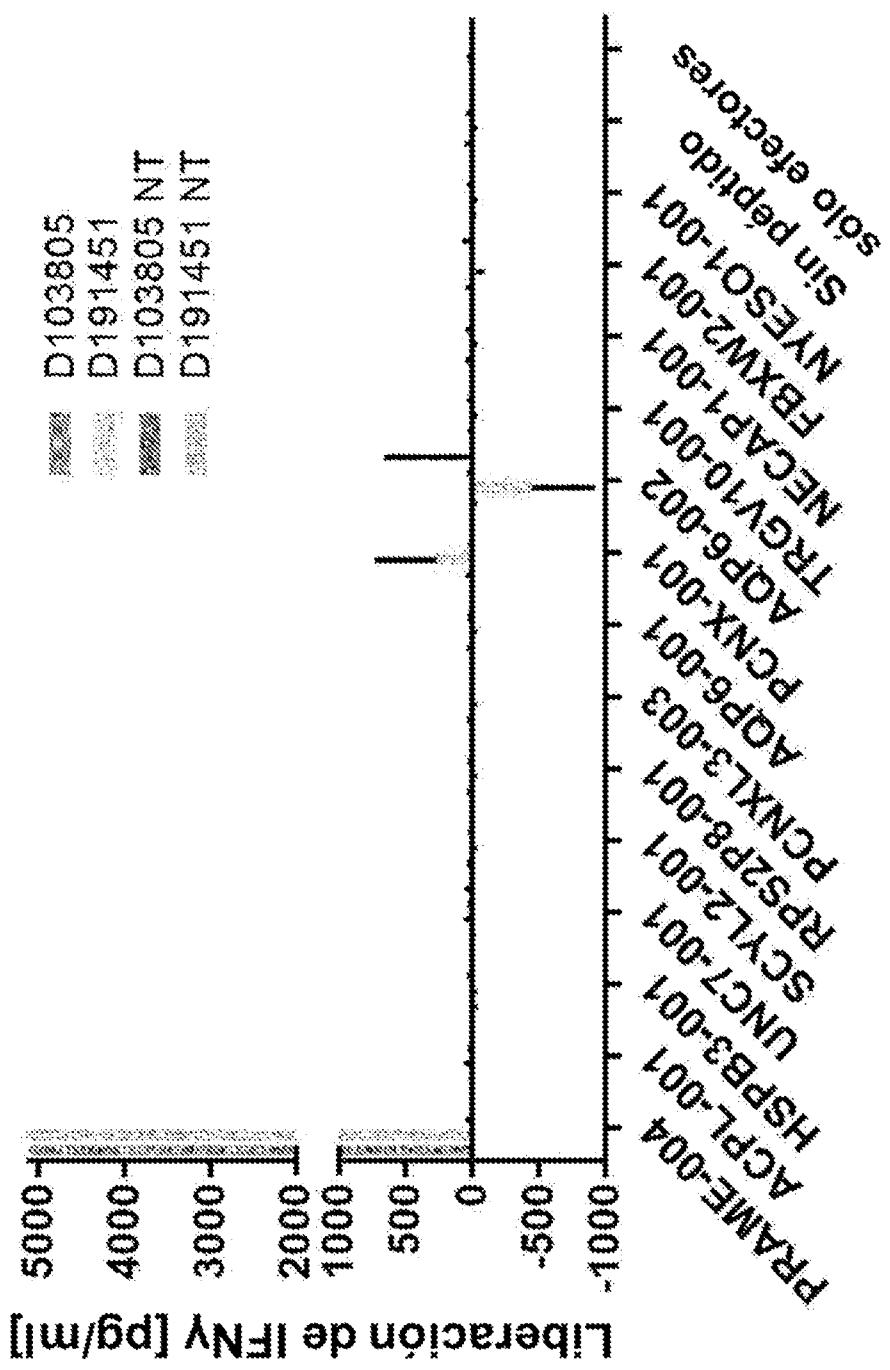
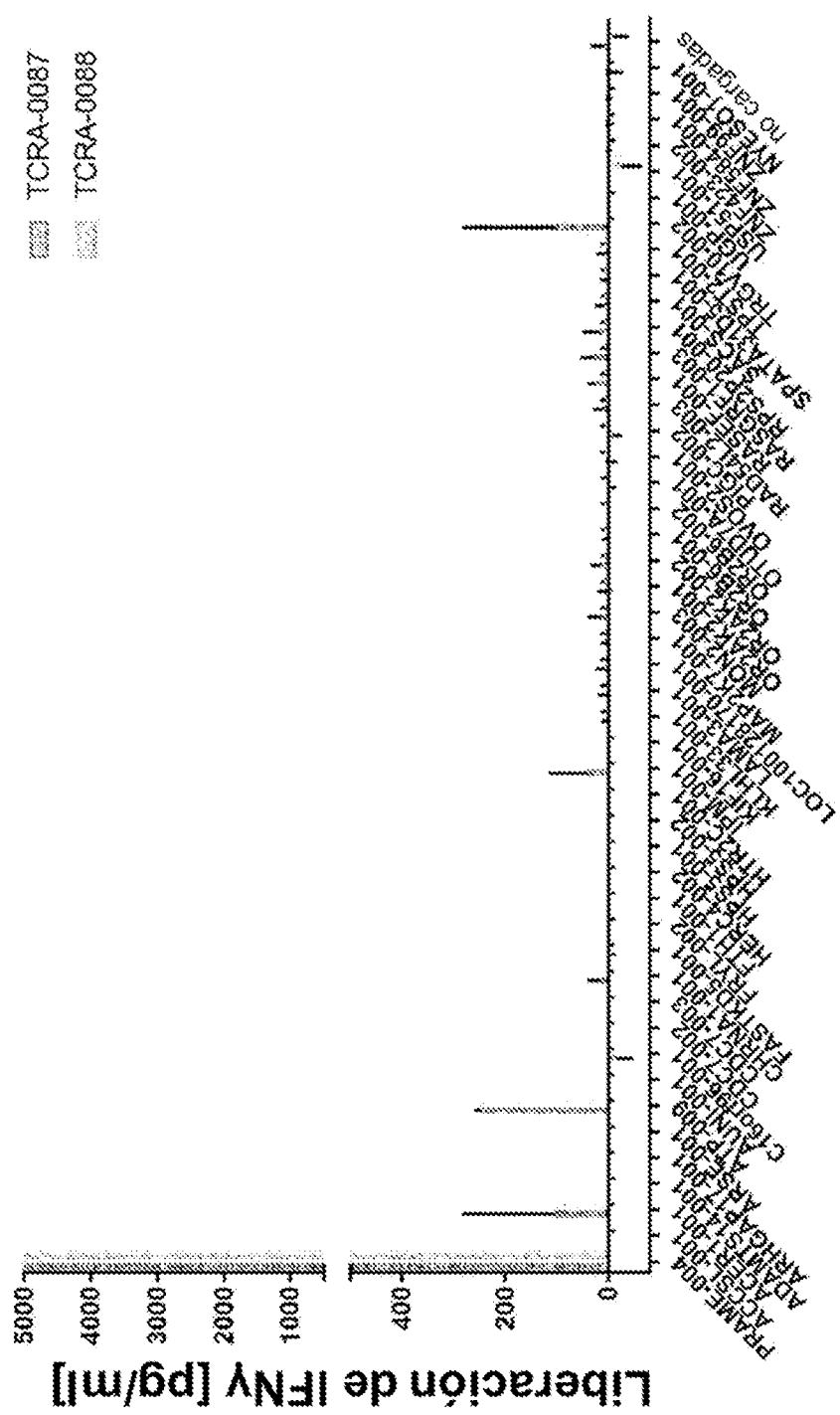


Figura 23



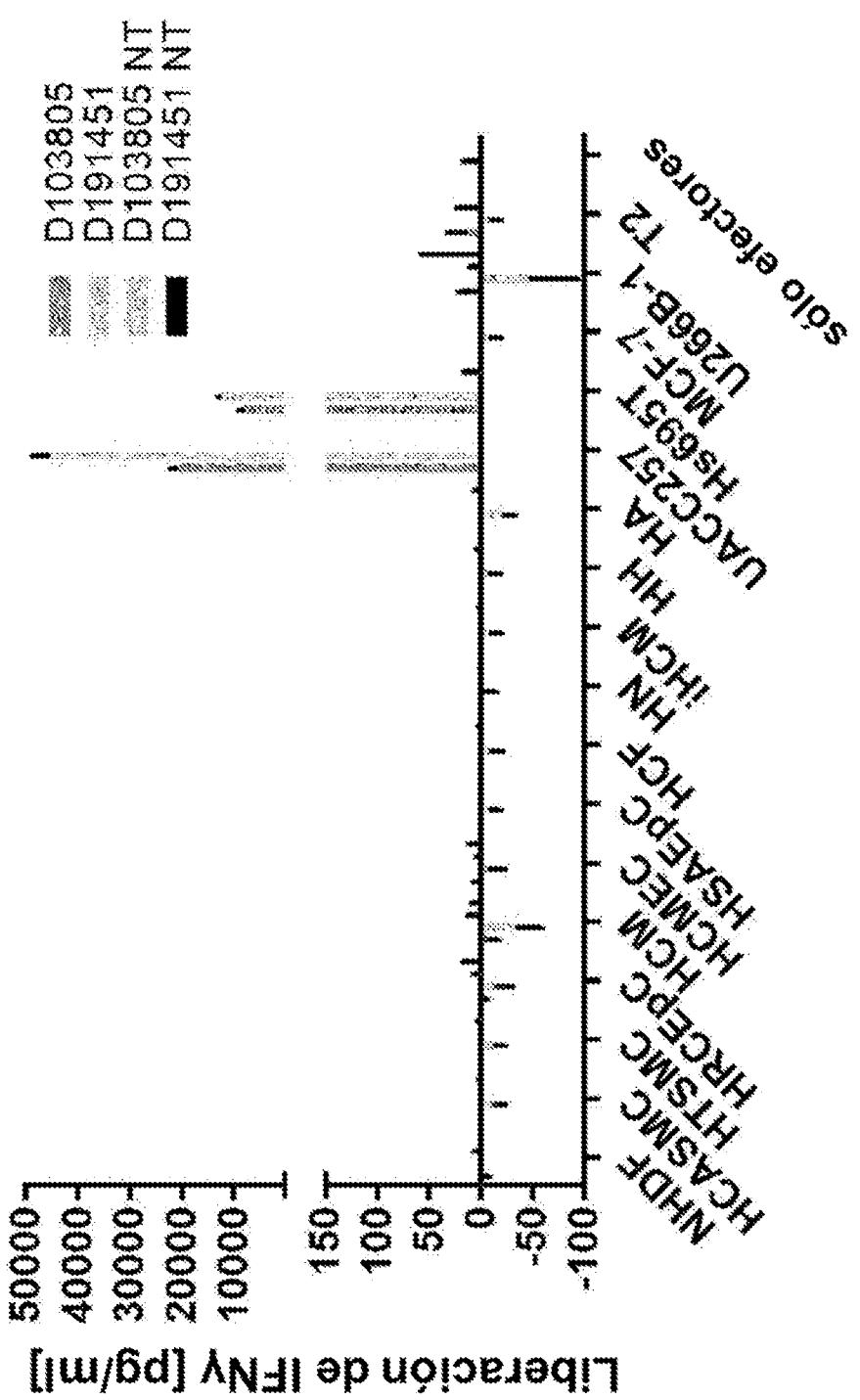


Figura 24

Figura 25

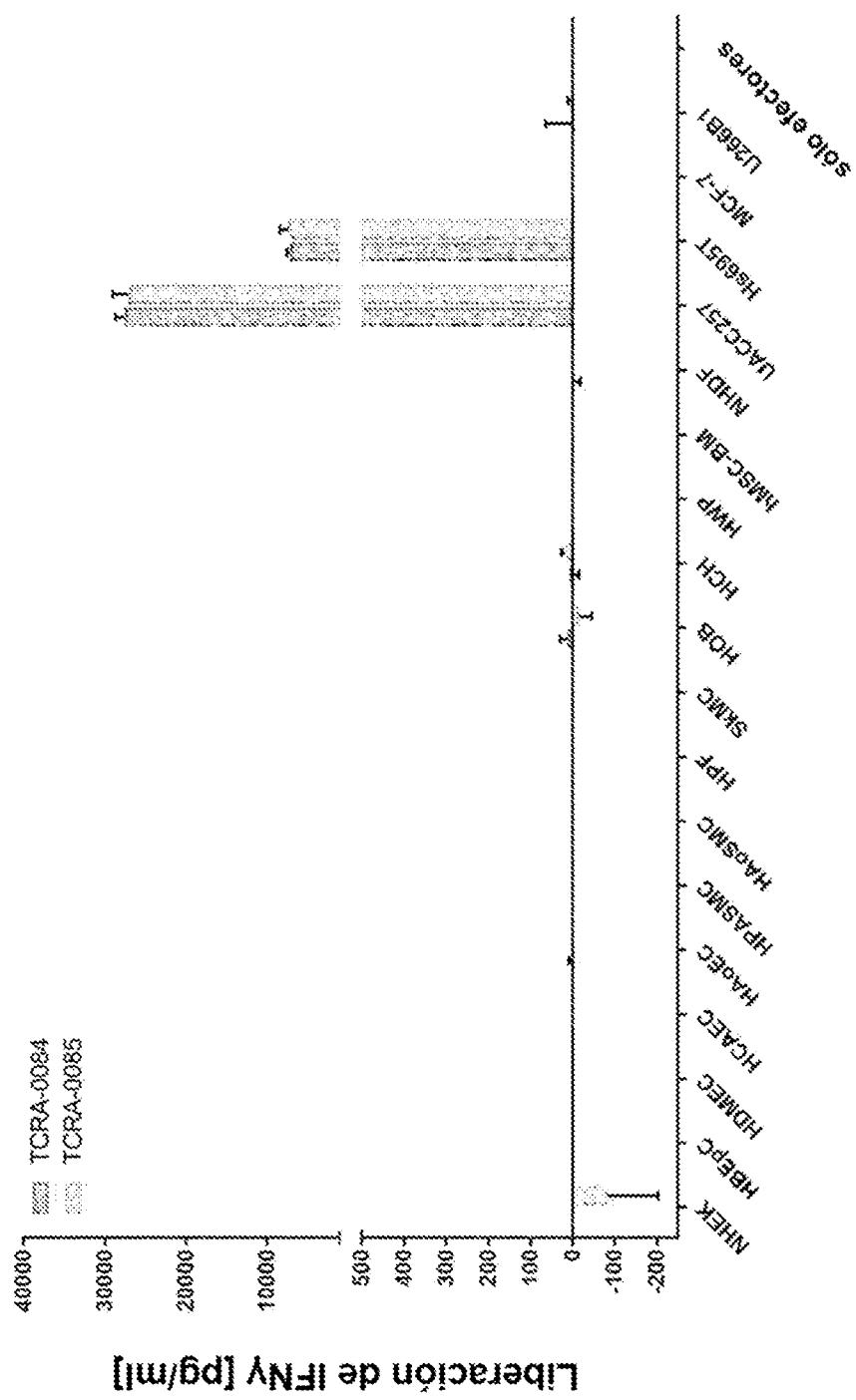


Figura 26

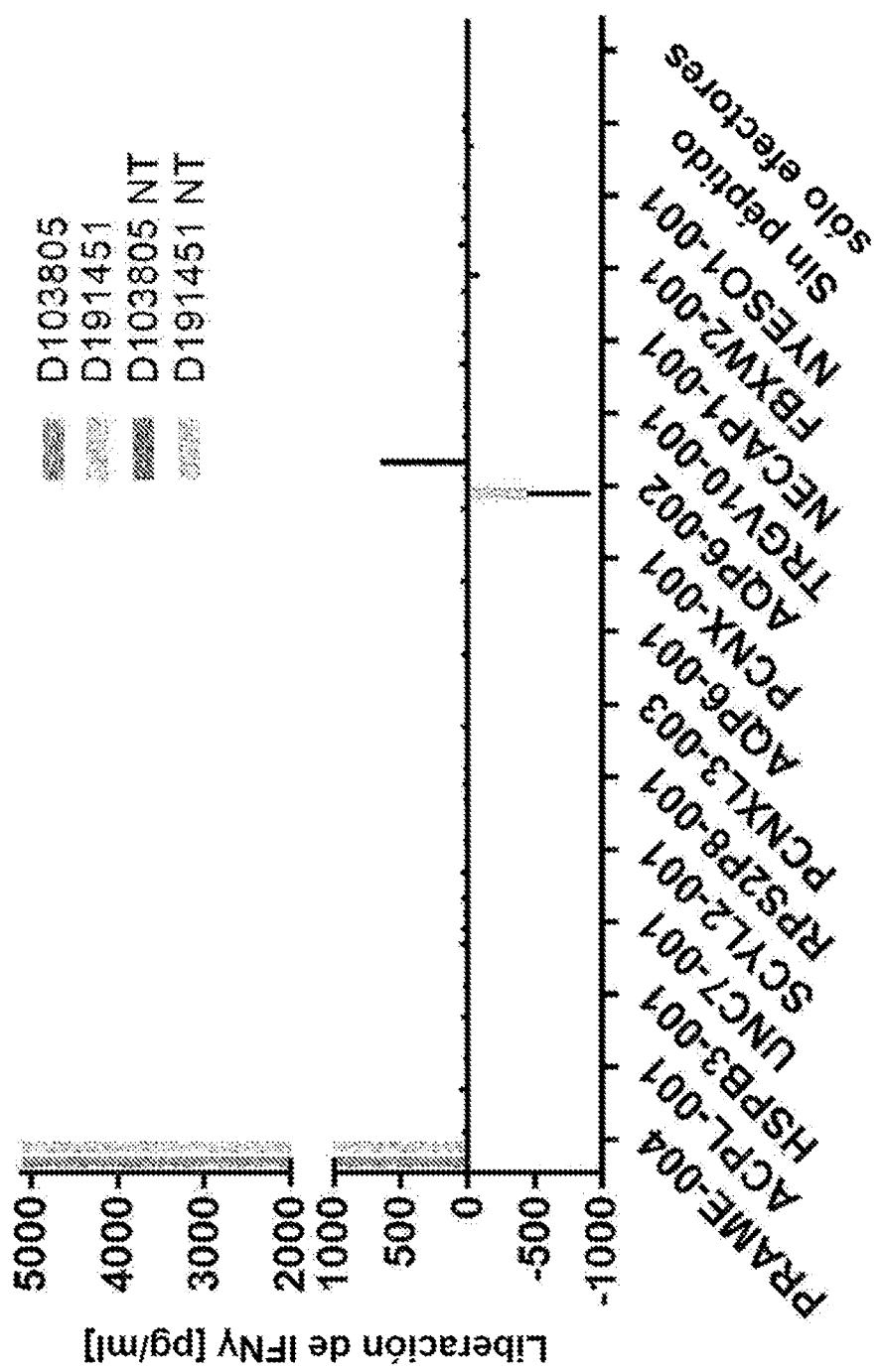


Figura 27

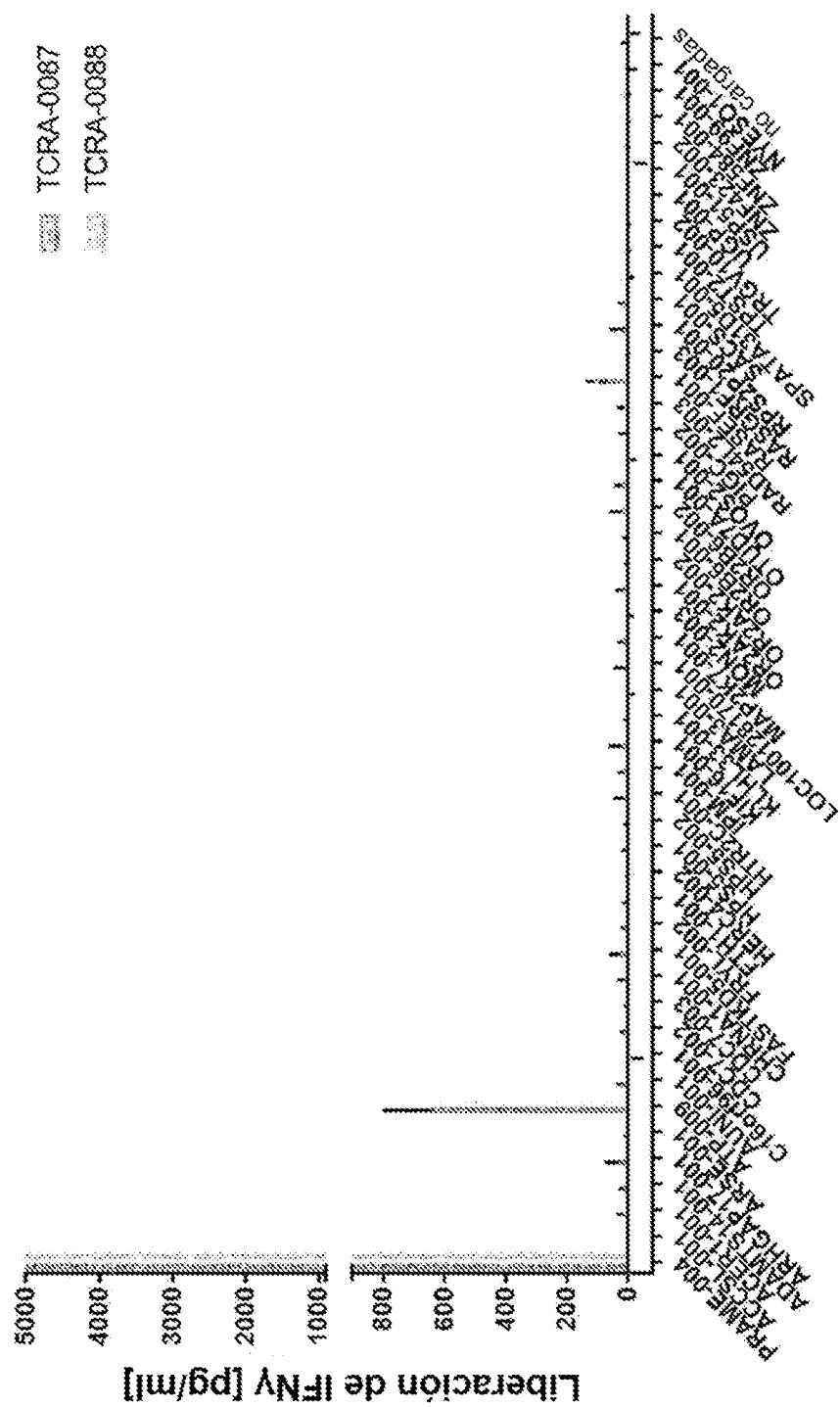


Figura 28

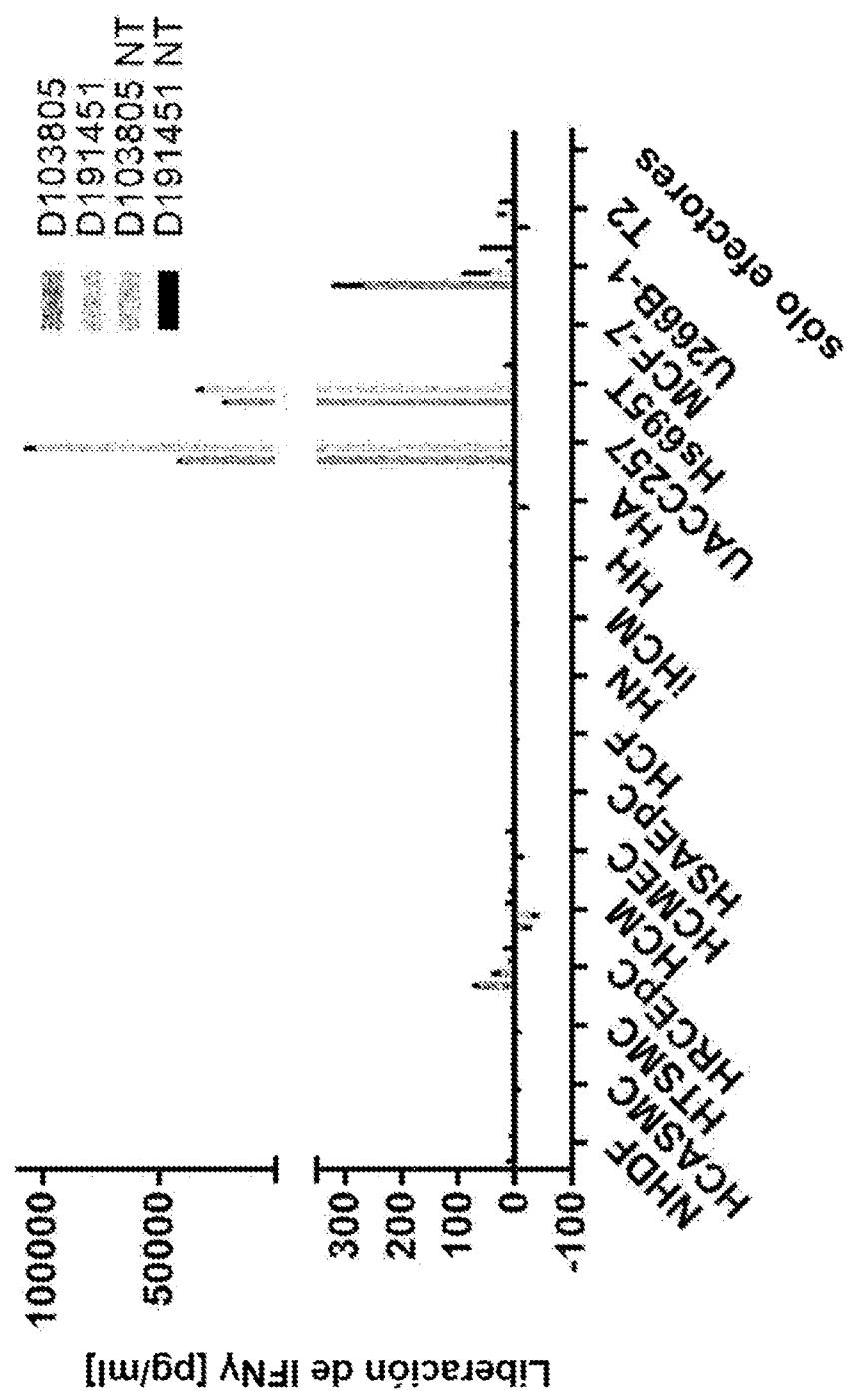


Figura 29

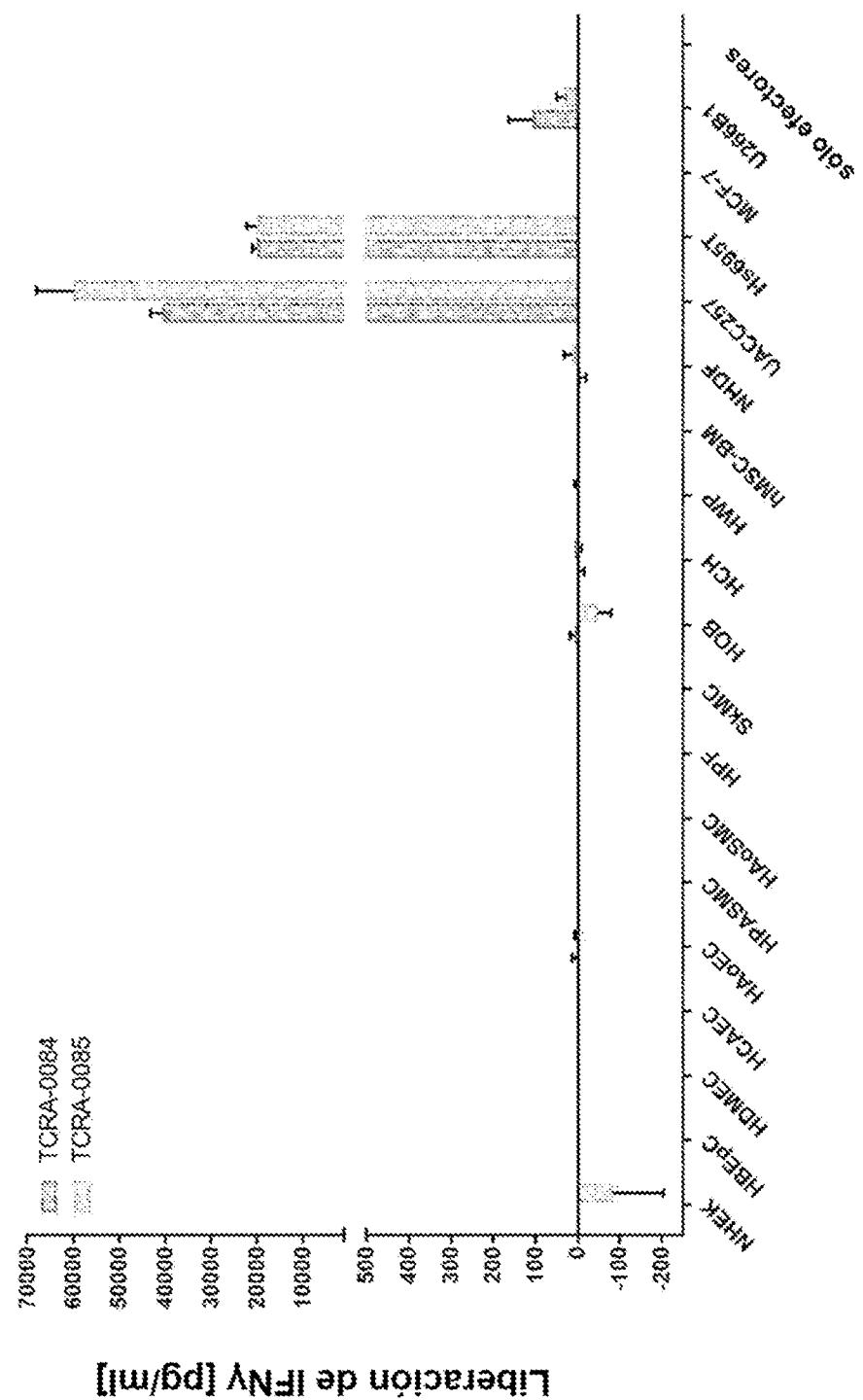
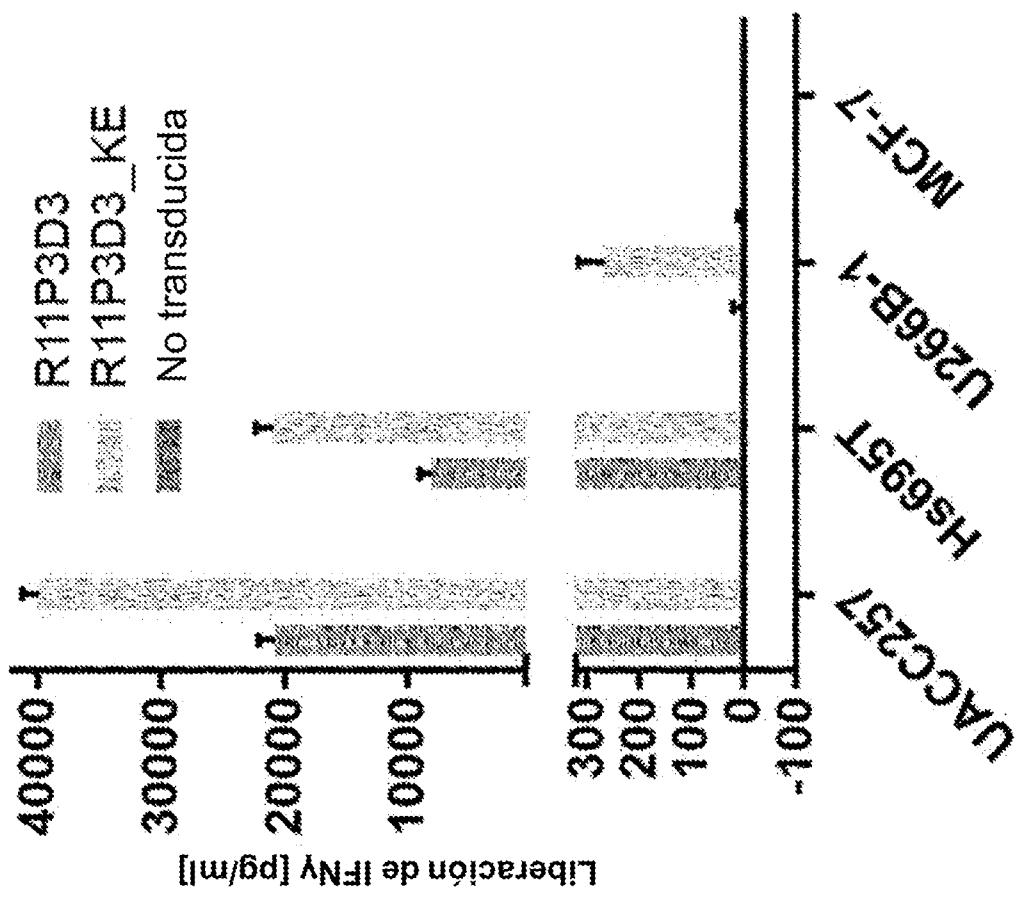


Figura 30



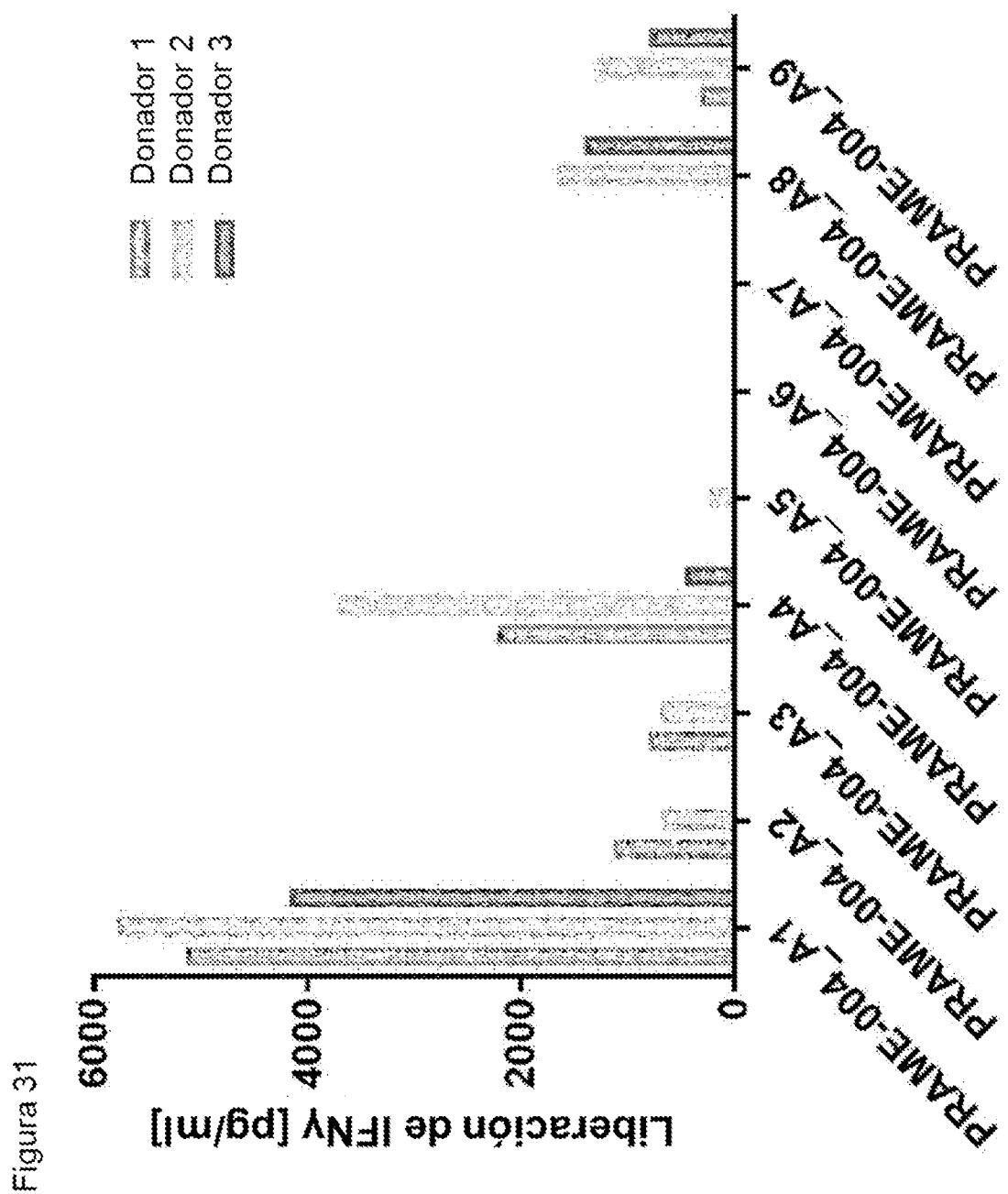


Figura 32

