



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 807 026**

⑮ Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2016 E 18167345 (0)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3372683**

⑭ Título: **Método para proporcionar linfocitos T específicos de tumor**

⑯ Prioridad:

**10.08.2015 EP 15180383
23.12.2015 EP 15202419**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2021

⑭ Titular/es:

**HS DIAGNOMICS GMBH (100.0%)
Wrangelstrasse 11-12
12165 Berlin, DE**

⑯ Inventor/es:

**HAMMER, RUDOLF y
HENNIG, STEFFEN**

⑯ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 807 026 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

Método para proporcionar linfocitos T específicos de tumor

5 La presente invención se refiere a un método para proporcionar una preparación de linfocitos T específicos de tumor y, en particular, reactivos frente a tumores, y a su uso, en particular para la transferencia adoptiva y el tratamiento del cáncer.

10 El cáncer es una de las causas más frecuentes de muerte en los países del mundo desarrollado. A pesar de la investigación exhaustiva en el campo del tratamiento del cáncer, todavía existe una inmensa necesidad de terapias para el tratamiento del cáncer. Recientemente, se han realizado esfuerzos para tratar el cáncer mediante la transferencia autóloga de células inmunitarias del paciente para combatir la enfermedad, en la que los linfocitos T obtenidos del tumor de un paciente se expandieron y se transfirieron adoptivamente.

15 Sin embargo, estas células transferidas conocidas generalmente carecen de alta especificidad y reactividad tumoral, puesto que simplemente se asemejan a una amplia colección de muchos tipos de linfocitos T y, por tanto, solo inducen una respuesta inmunitaria moderada y mejorable. En consecuencia, sería altamente deseable proporcionar linfocitos T autólogos altamente específicos de tumores y reactivos frente a tumores.

20 Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar dichas células, en particular para su uso en la transferencia adoptiva y el tratamiento del cáncer. La materia objeto de las reivindicaciones independientes logra este objetivo.

Términos y definiciones

25 La expresión "ácido nucleico" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un oligómero o polímero de nucleótidos. El oligómero o el polímero puede incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina), análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminopurina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina), bases modificadas químicamente, bases modificadas biológicamente (por ejemplo, bases metiladas), bases intercaladas, sitios abásicos, azúcares de ribosa (ARN), azúcares de 2'-desoxirribosa (ADN), azúcares de 3'-desoxirribosa o 2',3'-didesoxirribosa terminales, azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, arabinosa y hexosa) o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces de 5'-N-fosforamidita). Además, la cadena principal puede incluir azúcares modificados bloqueados (ANB), desbloqueados (AND), azúcares especulares (spiegelmer) o una cadena principal peptídica (ANP) o una mezcla de los mismos.

40 El término "sonda" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un ácido nucleico que puede hibridarse con un ácido nucleico complementario. Una sonda puede modificarse para incluir marcadores para la detección o la identificación tales como colorantes fluorescentes o isótopos radiactivos, haptenos para la captura, la detección o la inmovilización tales como biotina o digoxigenina, o grupos reactivos tales como tiol, alquino, azida o EDC, para la inmovilización, la ligadura o la derivatización.

45 La expresión "muestra tumoral" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra o a un conjunto de muestras obtenidas de un tumor de un paciente. El tumor también puede incluir una metástasis o una colección de metástasis.

50 La expresión "muestra no tumoral" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra o a un conjunto de muestras obtenidas de tejido en estrecha proximidad al tumor de un paciente.

55 La expresión "muestra de sangre" o "muestra a partir de sangre" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra de sangre o a un conjunto de muestras obtenidas a partir de sangre de un paciente. La expresión "muestra sin células" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra o a un conjunto de muestras obtenidas de un paciente que preferentemente no tiene linfocitos T o, más preferentemente, no tiene absolutamente ninguna célula que comprenda ácidos nucleicos. Las muestras sin células se obtienen preferentemente a partir de sangre, normalmente como muestras de suero o plasma. Otros ejemplos para muestras sin células son muestras obtenidas a partir de otros fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, fluido peritoneal, líquido sinovial, saliva, orina o heces.

60 El término "clonotipo" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un grupo de linfocitos T que comprenden secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T que presentan una secuencia de ácido nucleico prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT o que comprenden secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T que presentan una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT. Los clonotipos que presentan una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT también pueden denominarse de tipo agrupado.

5 La expresión "de tipo agrupado" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un grupo de linfocitos T que comprenden secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T que presentan una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT. La expresión "región variable" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la región recientemente generada mediante el reordenamiento del RLT que comprende un segmento J y un segmento V así como también la región CDR3 (véase la figura 1).

10 10 El término "CDR3" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la región determinante de la complementariedad hipervariable 3. El tamaño de CDR3 se caracteriza en particular por el número total de aminoácidos (AA) y nucleótidos respectivos de la cisteína conservada en el segmento V β o V α o V γ o V δ a la posición de la fenilalanina conservada en el segmento J β o J α , J γ o J δ .

15 15 La expresión "específicos de tumores" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere en particular a linfocitos T que aparecen en un tumor particular y que presentan en particular una distribución preferencial en el tumor particular.

20 20 La expresión "reactivos frente a tumores" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere en particular a linfocitos T que pueden modular de forma indirecta o directa el crecimiento, la viabilidad o la proliferación de células tumorales de un tumor particular. Dichos linfocitos T reactivos frente a tumores se caracterizan en particular por una expresión aumentada de citocinas o marcadores de activación superficial cuando se cultivan conjuntamente con células tumorales autólogas del tumor particular.

25 25 El término "LIT" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a linfocitos infiltrantes de tumores.

30 30 El término "CD45RA" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere al marcador de linfocitos T vírgenes humanos (PTPRC; identificación de Uniprot P07585; isoforma A).

35 35 El término "CCR7" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere al receptor de quimiocinas humano 7 (identificación de Uniprot P32248).

40 40 El término "CD62L" en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de adhesión celular sobre la superficie de linfocitos (identificación de Uniprot P14151). CD62L también se denomina L-selectina.

45 45 El término "CD25" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la cadena alfa del receptor de interleucina-2 humano (identificación de Uniprot P01589).

50 50 El término "Foxp3" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un marcador específico para linfocitos T reguladores T naturales y linfocitos T reguladores T inducidos (identificación de Uniprot B7ZIG1). Foxp3 también se denomina escurfina.

55 55 El término "LAG3" (gen de activación de linfocitos 3) en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un marcador para linfocitos T activados (UniProtKB: P18627).

60 60 El término "CD69" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un marcador para linfocitos T activados (Uniprot Q7108).

65 65 El término "CD137" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un marcador para linfocitos T activados (Uniprot Q07011).

70 70 El término "CD154" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un marcador para linfocitos T activados (Uniprot P29965).

75 75 El término "PD-1" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un receptor de superficie celular expresado por linfocitos T (Uniprot Q15116). PD-1 también se denomina CD279.

80 80 El término "B7-H4" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un marcador para linfocitos T activados (Uniprot Q7Z7D3). B7-H4 también se denomina VTCN1.

85 85 El término "OX40" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 4 (Uniprot P43489). OX40 también se denomina TNFSF4 o CD134.

90 90 El término "CD107a" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la proteína de membrana asociada a lisosoma 1 (Uniprot P11279), CD107a también se denomina LAMP-1.

95 95 El término "VISTA" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere al supresor de Ig de dominio V de la

activación de linfocitos T. VISTA también se denomina homólogo de PD-1 (PD-1 H).

El término "butirofilina" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una familia de proteínas que constituyen un subgrupo de la superfamilia IG que se expresan sobre linfocitos T activados.

5 La expresión "proteína de tipo butirofilina" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un marcador de linfocitos T activados.

10 El término "TNFalfa" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la citocina que se secreta por los linfocitos T activados (Uniprot P01375).

La expresión "interferón gamma" o "IFN gamma" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la citocina que se secreta por los linfocitos T activados (Uniprot P01579).

15 15 Si cualquier población celular se designa como "positiva" con respecto a cierta proteína marcadora, esta designación significará que dicha población celular puede teñirse con un anticuerpo marcado con colorante fluorescente común contra la proteína marcadora y proporcionará una señal de fluorescencia de una intensidad al menos un logaritmo mayor en comparación con las células no marcadas o las células marcadas con el mismo anticuerpo pero habitualmente conocidas como que no expresan dicha proteína marcadora. Como alternativa, la población celular 20 puede teñirse mediante una sonda de ácido nucleico marcada que sea capaz de hibridarse específicamente con un ARNm que codifique la proteína marcadora anteriormente mencionada o una entidad reguladora correlativa. La entidad correlativa de proteína marcadora puede representar un ARNm de factor de transcripción regulador de proteína marcadora, un ARN no codificante o cualquier otro ARN que se exprese conjuntamente específicamente en una población celular que exprese dicha proteína marcadora.

25 25 La expresión "marcador de activación de linfocitos T" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una molécula sobre la superficie de un linfocito T activado.

30 30 La alta afinidad en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la constante de disociación de la unión del ligando a la molécula diana, en la que la constante de disociación es, 10^{-7} mol/l, 10^{-8} mol/l o 10^{-9} mol/l o menos, y en la que el ligando no se une a moléculas de control, por ejemplo, proteínas, con características estructurales no relacionadas. Las moléculas de control son, a modo de ejemplo no limitante, proteínas plasmáticas tales como albúminas, globulinas, lipoproteínas, fibrinógenos, protrombina, proteínas de fase aguda y marcadores tumorales tales como CEA, CA19-9 o AFP y transferrina.

35 35 La alta especificidad en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la relación de dianas o analitos detectados adecuadamente y a la suma de todos los compuestos o sustancias detectados, en la que la relación es del 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 99,9 %.

40 40 La expresión "temperatura de hibridación óptima" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la temperatura a la que la sonda de la invención presenta la mayor probabilidad de unirse a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor dentro de la célula.

45 45 El término "nanooro" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una partícula de oro de tamaño submicrométrico.

Los números de identificación de Uniprot se refieren a las entradas en la Base de Conocimiento de UniProt.

50 50 Los números de DSMZ se refieren a entradas o depósitos en el Leibniz-Institut DSMZ- Colección de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Braunschweig, Alemania.

Un reactivo de transfección en el contexto de la presente invención se refiere a un compuesto que permite o apoya el proceso de introducir deliberadamente ácidos nucleicos dentro de células, en particular dentro de células inmunitarias humanas.

55 **Sumario de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para fabricar un receptor artificial de linfocitos T específicos de tumor. El método comprende las etapas de:

60 - proporcionar una preparación de linfocitos T específicos de tumor mediante las etapas de:

- seleccionar clones de linfocitos T específicos de tumor mediante:

65 - proporcionar una muestra tumoral obtenida de un paciente, en la que la muestra tumoral comprende linfocitos T que infiltraron el tumor;

- aislar una preparación de ácido nucleico de la muestra tumoral en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
- obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la preparación de ácido nucleico o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;
- seleccionar una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor a partir de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor a partir de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una etapa de selección de secuencias;

5

- b. clasificar clones de linfocitos T específicos de tumor mediante:
 - proporcionar una preparación de linfocitos obtenida del paciente;

10

- aislar células que comprenden la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada o la secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada de la preparación de linfocitos en una etapa de aislamiento.

15

- aislar un linfocito T específico de tumor individual de dicha preparación de linfocitos T específicos de tumor;

20

- determinar las regiones de CDR3 de ambas subunidades de dicho receptor de linfocitos T de dicho linfocito T específico de tumor individual aislado; y

25

- preparar un receptor de linfocito T artificial que comprende dichas regiones de CDR3 determinadas de ambas subunidades.

En determinadas realizaciones, la etapa de aislamiento comprende las etapas de:

30

- poner en contacto la preparación de linfocitos con un ligando específicamente reactivo que es capaz de unirse a una secuencia de aminoácidos comprendida dentro del segmento V del receptor de linfocitos T que corresponde a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada o la secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor, en la que el ligando se une a un marcador detectable, y

35

- aislar linfocitos T que llevan el marcador detectable de la preparación de linfocitos.

En particular, el segmento V está codificado por una molécula de ácido nucleico que se relaciona de forma única con la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada.

40

- En ciertas realizaciones, el ligando se une a la secuencia de aminoácidos con una constante de disociación de 10^{-7} , 10^{-8} o 10^{-9} mol/l o menos.

45

- En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada se relaciona de forma única con una secuencia de ácido nucleico que codifica el segmento V de la cadena beta del receptor de linfocitos T humano.

50

- En ciertas realizaciones, el ligando específicamente reactivo es un anticuerpo anti- V_β , que se refiere al segmento V de la cadena beta de un receptor de linfocitos T.

Dichos anticuerpos anti- V_β son conocidos, véase por ejemplo http://www.imgt.org/IMGTRepertoire/Regulation/antibodies/human/TRB/TRBV/Hu_TRBVMAb.html y puede obtenerse, por ejemplo, en Pierce Endogen, Serotec o Coulter.

55

- En ciertas realizaciones, la etapa de aislamiento comprende las etapas de:

- poner en contacto la preparación de linfocitos con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor, en la que la sonda de ácido nucleico se une a un marcador detectable;
- aislar linfocitos T que llevan el marcador detectable de la preparación de linfocitos.

En particular, la unión específica de la sonda de ácido nucleico a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada se refiere en particular a una hibridación de la sonda con la secuencia seleccionada, en particular en condiciones de alta rigurosidad.

En ciertas realizaciones, la etapa de aislamiento comprende las etapas de:

- poner en contacto la preparación de linfocitos con un ligando específicamente reactivo que es capaz de unirse a una secuencia de aminoácidos comprendida dentro de la región V del receptor de linfocitos T que corresponde a la secuencia de ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada o la secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor, en la que el ligando se une a un marcador detectable,
- aislar linfocitos T que llevan el marcador detectable de la preparación de linfocitos,
- poner en contacto las células aisladas con una sonda de ácido náucleo que se une específicamente a la secuencia de ácido náucleo específica del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada, en las que dicha sonda de ácido náucleo se une a otro marcador detectable, y
- aislar los linfocitos T que llevan el otro marcador detectable de las células aisladas anteriormente.

En ciertas realizaciones, la etapa de aislamiento comprende

- una etapa de separación, en la que la preparación de linfocitos se separa en una pluralidad de fracciones,
- una etapa de expansión, en la que las células comprendidas dentro de dicha pluralidad de fracciones se expanden en condiciones de cultivo celular, y
- una etapa de selección, en la que se selecciona al menos una fracción de dicha pluralidad de fracciones que comprende la secuencia de ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada.

En particular, la preparación de linfocitos se separa en la pluralidad de fracciones de manera que no toda la fracción de la pluralidad, preferentemente menos de la mitad de la pluralidad, más preferentemente menos del 10 por ciento de la pluralidad, incluso más preferentemente menos del 5 por ciento, más preferentemente menos del 1 por ciento, comprende la secuencia de ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada. Dicha separación puede conseguirse mediante la limitación del número de células por fracción de la pluralidad.

En ciertas realizaciones, cada una de las fracciones de la pluralidad comprende no más de 10^5 células, preferentemente no más de 10^4 células, más preferentemente no más de 10^3 células, incluso más preferentemente no más de 10^2 células.

En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos se separa en al menos 96 fracciones, preferentemente en 96, en las que en particular cada una de las fracciones comprende no más de 10^5 células.

40 En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos se separa en 96 fracciones a 384 fracciones.

En ciertas realizaciones, la etapa de selección comprende obtener secuencias de ácido náucleo del receptor de linfocitos T a partir de la pluralidad de fracciones e identificar fracciones que comprenden la secuencia de ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada, en la que en particular las secuencias de ácido náucleo del receptor de linfocitos T se obtienen mediante amplificación, en particular mediante PCR.

En ciertas realizaciones, las fracciones que comprenden la secuencia de ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada se identifican mediante una reacción de amplificación con cebadores que se hibridan específicamente con al menos una parte del ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionado, en las que en particular las fracciones que no comprenden la secuencia de ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada no presentan un producto de amplificación.

En ciertas realizaciones, las secuencias de ácido náucleo del receptor de linfocitos T se obtienen a partir de una alícuota de células comprendidas dentro de la fracción respectiva o a partir del sobrenadante de la fracción respectiva.

Ventajosamente, mediante dicha selección no son necesarias sondas caras con un gran retraso en la síntesis y la validación. Además, la realización mencionada anteriormente es aplicable a clonotipos muy raros debido a la sensibilidad de la PCR frente al nivel de fondo de la sonda. Adicionalmente, la etapa de expansión produce células que se dividen rápidamente que pueden aplicarse directamente en la expansión *in vitro* para el tratamiento potencial con células autólogas.

En ciertas realizaciones, la etapa de selección comprende poner en contacto las fracciones de la pluralidad con una sonda de ácido náucleo que se une específicamente a la secuencia de ácido náucleo del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada, en la que la sonda de ácido náucleo se une a un marcador detectable, y seleccionar al menos una fracción de la pluralidad que comprende linfocitos T que llevan el marcador detectable.

En ciertas realizaciones, la etapa de separación va precedida de las etapas de

- 5 - poner en contacto la preparación de linfocitos con un ligando específicamente reactivo que es capaz de unirse a una secuencia de aminoácidos comprendida dentro del segmento V del receptor de linfocitos T que corresponde a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada o a la secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada, en la que el ligando se une a un marcador detectable, y
- 10 - aislar linfocitos T que llevan el marcador detectable de la preparación de linfocitos, en las que después los linfocitos T aislados se someten a la etapa de separación como se ha descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, la etapa de aislamiento comprende adicionalmente

- 15 - una segunda etapa de separación, en la que la fracción seleccionada se separa en una segunda pluralidad de fracciones,
- una segunda etapa de expansión, en la que las células comprendidas en la segunda pluralidad de fracciones se expanden en condiciones de cultivo celular, y
- 20 - una segunda etapa de selección, en la que se selecciona al menos una fracción de la segunda pluralidad de fracciones que comprende la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada.
- 25 En particular, la etapa de separación, la etapa de expansión y la etapa de selección pueden repetirse con cada nueva fracción seleccionada que comprenda la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada. Preferentemente, la etapa de separación, la etapa de expansión y la etapa de selección se repiten de una a cuatro veces.
- 30 En ciertas realizaciones, la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T se obtiene mediante la secuenciación de los ácidos nucleicos de las secuencias de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos de la preparación de ácido nucleico se secuencian en paralelo. Un método adecuado para la secuenciación en paralelo se desvela en el documento WO 2014/096394 A1.
- 35 En ciertas realizaciones, la preparación de ácido nucleico comprende ADN genómico de las células de la muestra tumoral, en particular de los linfocitos T que infiltraron el tumor.

En ciertas realizaciones, la preparación de ácido nucleico comprende al menos 10 ng de ADN de linfocitos T maduros o activados de la muestra tumoral, que corresponde en particular a la cantidad de ADN de aproximadamente 1.500 linfocitos T maduros. La cuantificación de la cantidad de ADN de linfocitos T maduros puede determinarse mediante un método conocido por el experto en la materia, tal como, por ejemplo, PCR cuantitativa o PCR de gotitas digital. La secuenciación de la preparación de ácido nucleico puede incluir la secuenciación de una muestra de referencia con una cantidad conocida de ADN. Adicionalmente, la cantidad de linfocitos T maduros en la muestra tumoral puede medirse mediante tinción inmunohistoquímica y microscopía o clasificación celular mediante FACS.

En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos se proporciona mediante la muestra tumoral obtenida del paciente, mediante una muestra de sangre obtenida del paciente o una muestra de tumor completo obtenida del paciente.

50 Ventajosamente, el método de la invención es independiente de linfocitos T específicos de tumor viables y/o proliferativos que se obtienen de la muestra tumoral para identificar un clonotipo específico de tumor y para prepararlo. Una vez que uno o más clonotipos específicos de tumores se identifican por medio de una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor o una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor, pueden prepararse a partir de otras fuentes tales como otra muestra tumoral o la sangre del paciente.

En ciertas realizaciones, la etapa de selección de secuencia comprende las etapas de:

- 60 - alinear la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T obtenidas a partir de la muestra tumoral;
- agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra tumorales, en las que
- 65 a) secuencias de ácido nucleico de receptores de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular

presentan una secuencia de ácido nucleico prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT, y/o

5 b) secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia de aminoácidos idéntica con respecto a la región variable del RLT;

10 - determinar el número de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T dentro de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T asociadas a cada clonotipo, produciendo de este modo una frecuencia de clonotipo para cada uno de dichos clonotipos,

15 - seleccionar un clonotipo específico de tumor a partir de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clones de la muestra tumoral, y

20 - seleccionar una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico de los receptores de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo específico de tumor seleccionado como la secuencia de ácido nucleico del receptor específico de tumor.

25 En particular, después de la secuenciación, los pares que unen todas las lecturas de secuencia de ácido nucleico idénticas y relacionadas que se desvían hasta un desapareamiento de pares de bases se agrupan y se designan como clonotipos.

30 En ciertas realizaciones, un clonotipo específico de tumor se selecciona entre la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que es uno de los 50 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral. En ciertas realizaciones, un clonotipo específico de tumor se selecciona entre la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que es uno de los 20 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral.

35 En particular, una primera secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T es prácticamente idéntica a una segunda secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T, si ambas secuencias difieren en no más de una posición.

40 En ciertas realizaciones, una primera secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T es prácticamente idéntica a una segunda secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T, si ambas secuencias difieren en no más de una posición, y la primera secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T presenta en la muestra respectiva, en particular en la muestra tumoral, una frecuencia de al menos veinte veces en comparación con la segunda secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T. En consecuencia, tanto la primera como la segunda secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T se asignan al mismo clonotipo.

45 Asimismo, una primera secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T es prácticamente idéntica a una segunda secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T si ambas secuencias de aminoácidos difieren en no más de una o dos posiciones entre sí. Las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T mencionadas anteriormente pueden estar comprendidas dentro de la cadena alfa o beta del RLT α/β o dentro de la cadena gamma o delta del RLT γ/δ .

50 En particular, la frecuencia de clonotipo es una medida de la frecuencia relativa o absoluta del linfocito T identificada por la secuencia de ácido nucleico del RLT dentro de la muestra tumoral.

55 En particular, la frecuencia de clonotipo en una muestra dada es una medida de la frecuencia relativa o absoluta del linfocito T identificada por la secuencia de ácido nucleico del RLT dentro de dicha muestra.

60 En ciertas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad mencionada anteriormente están comprendidas dentro de secuencias de ácido nucleico que codifican una de las cadenas polipeptídicas que forman un receptor de linfocitos T humano, en particular RLT α/β o RLT γ/δ . En ciertas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad mencionada anteriormente no comprenden secuencias de ácido nucleico no codificantes. Las secuencias no codificantes se refieren a clonotipos con codones de parada o desplazamientos del marco de lectura que conducen a secuencias de proteínas RLT no funcionales.

65 En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor se

caracteriza por una longitud de 30 nucleótidos a 110 nucleótidos.

En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor codifica una secuencia de aminoácidos única comprendida dentro de una cualquiera de las cadenas polipeptídicas (alfa, beta, gamma y delta) que forman un receptor de linfocitos T humano, en el que la secuencia de aminoácidos única aparece exclusivamente en un clonotipo o tipo agrupado particular y no en ningún otro clonotipo o tipo agrupado.

En consecuencia, la etapa de selección comprende adicionalmente o como alternativa las etapas de:

10 - alinear la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T obtenidas a partir de la muestra tumoral;

15 - agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en la que las secuencias de aminoácidos de los receptores de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia de aminoácidos idéntica o prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT,

20 - determinar el número de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T dentro de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T asociadas a cada clonotipo, produciendo de este modo una frecuencia de clonotipo para cada uno de dichos clonotipos,

25 - seleccionar un clonotipo específico de tumor a partir de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y

30 - seleccionar una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T a partir de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico de los receptores de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor seleccionado como la secuencia de aminoácidos del receptor específico de tumor.

35 En ciertas realizaciones, uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en particular el clonotipo más frecuente, y uno o más clonotipos adicionales de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenden una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se seleccionan como clonotipos específicos de tumor, y se aíslan de la preparación de linfocitos, en particular poniendo en contacto el linfocito con sondas de ácido nucleico que se unen específicamente a las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor comprendidas dentro de los clonotipos seleccionados, en las que dichas sondas de ácido nucleico se unen a un marcador y la célula que lleva el marcador se aíslan de la preparación de linfocitos.

50 En ciertas realizaciones, los 5 clonotipos más frecuentes, los 10 clonotipos más frecuentes, los 15 clonotipos más frecuentes o los 20 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral y/o uno o más clonotipos adicionales de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenden una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de los 5 clonotipos más frecuentes, los 10 más frecuentes clonotipos, los 15 clonotipos más frecuentes o los 20 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se seleccionan como clones específicos de tumor, y se aíslan de la preparación de linfocitos, en particular poniendo en contacto el linfocito con un ligando específicamente reactivo que es capaz de unir una secuencia de aminoácidos comprendida dentro del segmento V del receptor de linfocitos T que corresponde a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor o a la secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada comprendida dentro de los clonotipos seleccionados, en la que dicho ligando se une a un marcador detectable y las células que llevan el marcador se aíslan de la preparación de linfocitos.

55 En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del receptor específico de tumor codifica la región CDR3 del receptor de linfocitos T. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del receptor específico de tumor comprende o está comprendida dentro de la región CDR3 del receptor de linfocitos T.

60 En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente

- proporcionar una muestra no tumoral obtenida del paciente;
- aislar una preparación de ácido nucleico de la muestra no tumoral en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
- obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la preparación de ácido nucleico, produciendo una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T no específicos de tumor;
- alinear la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T no específicos de tumor obtenidas a partir de la muestra no tumoral;
- agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T no específicos de tumor en una pluralidad de clonotipos no tumorales, en las que
 - a) las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3 y/o
 - b) las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3;
- seleccionar un clonotipo específico de tumor de entre la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que
 - el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y
 - el clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral está ausente en la muestra no tumoral o puede asignarse a un clonotipo no específico de tumor que muestra una frecuencia (dentro de la muestra no tumoral) de no más del 20 %, el 15 %, el 10 % o el 5 % de la frecuencia del clonotipo específico de tumor.
- En particular, las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T no específicos de tumor se agrupan en la pluralidad de clonotipos no específicos de tumor de la misma manera que las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T obtenidas del tumor en la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en particular para permitir una asignación de un clonotipo de la muestra tumoral a un clonotipo no tumoral.
- En particular, un clonotipo específico de tumor puede asignarse a un clonotipo no específico de tumor, si
 - a) una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es prácticamente idéntica a una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo no tumoral y/o
 - b) una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra no tumoral.

Análogamente, un clonotipo específico de tumor está ausente en la muestra no tumoral si este clonotipo no puede asignarse a ninguno de los clonotipos de la muestra no tumoral.

- En ciertas realizaciones, la muestra no tumoral es una muestra de tejido no tumoral adyacente al tumor. Dicho tejido no tumoral puede identificarse mediante técnicas comunes tales como examen de ultrasonido, radiografía, TC o inmunotinción.

- En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente

- proporcionar una muestra no tumoral obtenida del paciente;
- aislar una preparación de ácido nucleico de la muestra no tumoral en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
- 5 - obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la preparación de ácido nucleico y una pluralidad de secuencias de aminoácidos de linfocitos T codificadas por la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T, produciendo una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T no específicos de tumor;
- 10 - alinear la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T no específicos de tumor obtenidas a partir de la muestra no tumoral;
- agrupar secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T no específicos de tumor en una pluralidad de clonotipos no específicos de tumor, en los que las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica o prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3,
- 15 - seleccionar un clonotipo específico de tumor a partir de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que
 - el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y
- 20 - el clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral está ausente en la muestra no tumoral o puede asignarse a un clonotipo no específico de tumor que muestra una frecuencia (dentro de la muestra no tumoral) de no más del 20 %, el 15 %, el 10 % o el 5 % de la frecuencia del clonotipo específico de tumor.
- 25 - En particular, las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T no específicos de tumor se agrupan en la pluralidad de clonotipos no específicos de tumor específicos de la misma manera que las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T obtenidas del tumor dentro de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en particular para permitir una asignación de un clonotipo de la muestra tumoral a un clonotipo no tumoral.
- 30 - En particular, un clonotipo específico de tumor puede asignarse a un clonotipo no específico de tumor, si cualquiera de las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo no tumoral.
- 35 - En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente:
 - 40 - proporcionar una muestra de sangre obtenida del paciente;
 - aislar una preparación de ácido nucleico de la muestra de sangre en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
 - obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la preparación de ácido nucleico,
 - alinear la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;
 - 45 - agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias del receptor de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra de sangre, en las que
 - 50 - a) las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3, y/o
 - b) las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por las secuencias del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3;
- 55 -
- 60 -

- seleccionar un clonotipo específico de tumor a partir de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que

5 • el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y

10 • el clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral puede asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestra una frecuencia inferior a la frecuencia del clonotipo específico de un tumor.

15 En particular, las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T obtenidas a partir de la muestra de sangre se agrupan en la pluralidad de clonotipos de la muestra de sangre de la misma manera que las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T obtenidas a partir del tumor en la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en particular para permitir una asignación de un clonotipo de la muestra tumoral a un clonotipo de la muestra de sangre.

20 En particular, un clonotipo específico de tumor puede asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre, si

25 a) una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo presenta una secuencia prácticamente idéntica a una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra de sangre y/o

30 b) una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra de sangre.

35 En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente:

- proporcionar una muestra de sangre obtenida del paciente;
- aislar una preparación de ácido nucleico de la muestra de sangre en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
- obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la preparación de ácido nucleico y una pluralidad de secuencias de aminoácidos de linfocitos T codificadas por la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T,
- alinear la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T;
- agrupar secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias de receptores de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra de sangre, en la que las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT
- seleccionar un clonotipo específico de tumor entre la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que

55 • el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y

60 • el clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral puede asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestra una frecuencia por debajo de la frecuencia del clonotipo específico de un tumor.

65 En particular, las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T obtenidas a partir de la muestra de sangre se agrupan en la pluralidad de clonotipos de la muestra de sangre de la misma manera que las secuencias de

aminoácidos del receptor de linfocitos T obtenidas a partir del tumor en la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en particular para permitir una asignación de un clonotipo de la muestra tumoral a un clonotipo de la muestra de sangre.

5 En particular, un clonotipo específico de tumor puede asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre, si cualquiera de las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo presenta una secuencia idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra de sangre.

10 En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente

- proporcionar una muestra sin células obtenida del paciente;

15 - aislar una preparación de ácido nucleico de la muestra sin células en una etapa de aislamiento de ácidos nucleicos;

- obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la preparación de ácido nucleico,

20 - alinear la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;

- agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra sin células, en las que

25 a) las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3, y/o

30 b) las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3;

- seleccionar un clonotipo específico de tumor a partir de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que

35 • el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y

40 • el clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral puede asignarse a un clonotipo de la muestra sin células, en particular a un clonotipo sin células que muestra una frecuencia superior al 0,001 % de todas las frecuencias en la pluralidad de clonotipos de la muestra sin células.

45 En particular, las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T obtenidas a partir de la muestra sin células se agrupan en la pluralidad de clonotipos de la muestra sin células de la misma manera que las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T obtenidas a partir del tumor en la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en particular para permitir una asignación de un clonotipo de la muestra tumoral a un clonotipo de la muestra sin células.

50 En particular, puede asignarse un clonotipo específico de tumor a un clonotipo de la muestra sin células, si

- a) cualquiera de las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es prácticamente idéntica a un linfocito T la secuencia de ácido nucleico del receptor comprendida dentro del clonotipo de la muestra sin células, y/o

55 b) una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T

codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra sin células.

En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente

- 5 - proporcionar una muestra sin células obtenida del paciente;
- aislar una preparación de ácido nucleico de la muestra sin células en una etapa de aislamiento de ácidos nucleicos;
- 10 - obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de la preparación de ácido nucleico y una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;
- 15 - alinear la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T;
- agrupar secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas en la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra sin células, en las que las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica o prácticamente idéntica con respecto a la región variable del RLT, en particular la región CDR3;
- 20 - seleccionar un clonotipo específico de tumor a partir de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que
- 25
 - el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y
 - 30
 - el clonotipo específico de un tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral puede asignarse a un clonotipo de la muestra sin células, en particular a un clonotipo sin células que muestra una frecuencia superior al 0,001 % de todas las frecuencias en la pluralidad de clonotipos de la muestra sin células.
- 35

En particular, las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T obtenidas a partir de la muestra sin células se agrupan en la pluralidad de clonotipos de la muestra sin células de la misma manera que las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T obtenidas a partir del tumor en la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en particular para permitir una asignación de un clonotipo de la muestra tumoral a un clonotipo de la muestra sin células.

40 En particular, puede asignarse un clonotipo específico de tumor a un clonotipo de la muestra sin células, si cualquiera de las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra sin células.

45 50 En ciertas realizaciones, el clonotipo específico de tumor seleccionado no puede asignarse a un clonotipo conocido que sea reactivo frente al citomegalovirus humano o frente al virus de Epstein-Barr.

Dicha asignación puede realizarse mediante métodos bioinformáticos, en los que en particular una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor comprendida dentro del clonotipo específico de tumor seleccionado se compara con secuencias de ácido nucleico de clonotipos conocidos que son reactivos frente al citomegalovirus humano o frente al virus de Epstein-Barr.

55 En particular, el clonotipo específico de tumor seleccionado no puede asignarse a un clonotipo conocido que sea reactivo frente al citomegalovirus humano o frente al virus de Epstein-Barr, si

- 60 a) ninguna de las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico de linfocitos T comprendidas dentro este clonotipo es prácticamente idéntica a una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo conocido,
- 65 b) ninguna de las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por una secuencia de ácido

nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo conocido, o

5 c) ninguna de las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos de linfocitos T comprendidas dentro de este clonotipo es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo conocido.

10 En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente las etapas de:

- seleccionar un clonotipo específico de tumor a partir de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en el que

15 • el clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y

20 • el clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral puede asignarse a otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de uno de los 100 clonotipos específicos de tumores más frecuentes.

25 • el clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral puede asignarse a otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de uno de los 100 clonotipos específicos de tumores más frecuentes.

30 En ciertas realizaciones, el clonotipo más frecuente de los clonotipos de la muestra tumoral u otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido n úcleo de receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo más frecuente se selecciona como clonotipo específico de tumor, en el que en particular el clonotipo más frecuente está ausente en la muestra no tumoral o puede asignarse a un clonotipo no tumoral que muestra una frecuencia (dentro de la muestra no tumoral) de no más del 20 %, del 15 %, del 10 % o del 5 % de la frecuencia del clonotipo más frecuente, y/o puede asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestra una frecuencia por debajo de la frecuencia del clonotipo más frecuente, y/o puede asignarse a un clonotipo sin células, en particular a un clonotipo sin células que muestra una frecuencia superior al 0,001 % de todas las frecuencias de la pluralidad de clonotipos de la muestra de suero, y/o puede asignarse a otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de los clonotipos específicos de tumor más frecuentes.

35 45 En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente:

- seleccionar 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de la muestra tumoral, en los que

50 • los clonotipos específicos de tumor son 5, 10, 15 o 20 de los 100 más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o son otros clonotipos de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenden una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de los 5, 10 o 20 clonotipos específicos de cada uno de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral y, opcionalmente,

55 • los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral están ausentes en la muestra no tumoral o pueden asignarse a un clonotipo no específico de tumor que presente una frecuencia (dentro de la muestra no tumoral) de no más del 20 %, el 15 %, el 10 % o el 5 % de la frecuencia de los clonotipos específicos de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y/o

60 • los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral pueden asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestre una

65

frecuencia por debajo de la frecuencia de dichos clonotipos específicos de tumores, y/o

- los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral pueden asignarse a un clonotipo de la muestra sin células, en particular a un clonotipo sin células que muestre una frecuencia superior al 0,001 % de todas las frecuencias en la pluralidad de clonotipos de la muestra sin células, y/o

- los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumores de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral pueden asignarse a otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenda una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que sea idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de los clonotipos específicos de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral.

En particular, cada uno de los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor se compara individualmente y se asigna en particular, a los clonotipos de la muestra no tumoral, muestra de sangre y/o muestra sin células mencionadas anteriormente.

En ciertas realizaciones,

- uno cualquiera de los uno, 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de los 100 más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo no específico de tumor, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificado por una secuencia del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra no tumoral o una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida por dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra no tumoral, y/o

- uno cualquiera de los uno, 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de los 100 más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo de la muestra de sangre, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra de sangre o si un linfocito T la secuencia de aminoácidos comprendida con dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra de sangre, y/o

- uno cualquiera de los uno, 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de los 100 más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo de la muestra sin células, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor o los clonotipos específicos de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra sin células, o si una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra sin células.

En ciertas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente:

- seleccionar 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de la muestra tumoral, en los que
 - los clonotipos específicos de tumor son los 5 clonotipos más frecuentes, los 10 clonotipos más frecuentes, los 15 clonotipos más frecuentes o los 20 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o son otros clonotipos de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenden una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral y, opcionalmente,
 - los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados están ausentes en la muestra no tumoral o

pueden asignarse a un clonotipo no específico de tumor que presente una frecuencia (dentro de la muestra no tumoral) de no más del 20 %, el 15 %, el 10 % o el 5 % de la frecuencia de los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados dentro de la pluralidad de los clonotipos de la muestra tumoral, y/o

- 5 • los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral pueden asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestre una frecuencia por debajo de la frecuencia de los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados dentro de la pluralidad de los clonotipos de la muestra tumoral, y/o
- 10 • los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral pueden asignarse a un clonotipo de la muestra sin células, en particular a un clonotipo sin células que muestra una frecuencia superior al 0,001 % de todas las frecuencias en la pluralidad de clonotipos de la muestra sin células, y/o
- 15 • los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral pueden asignarse a otro clonotipo de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenda una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que sea prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de los clonotipos específicos de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral.

En particular, cada uno de los 5, 10 o 20 clonotipos específicos de tumores seleccionados se compara individualmente y se asigna, en particular, a los clonotipos de la muestra no tumoral, la muestra de sangre y/o la muestra sin células mencionadas anteriormente.

- 25 En ciertas realizaciones,
- uno cualquiera de los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo no específico de tumor, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra no tumoral, o si una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra no tumoral, y/o
- uno cualquiera de los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo de la muestra de sangre, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por un compuesto de ácido nucleico del receptor de linfocitos T dentro del clonotipo de la muestra de sangre, o si una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra de sangre, y/o
- uno cualquiera de los 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de la pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo de la muestra sin células, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra sin células, o si una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de la pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro del clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro del clonotipo de la muestra sin células.

En ciertas realizaciones, la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada es un oligonucleótido biciatenario, en la que una primera cadena del oligonucleótido es complementaria a la secuencia de ácido nucleico específica de tumor seleccionada y conectada a una partícula de nanooro y en la que una segunda cadena es complementaria a la primera cadena y lleva una marcador luminiscente, en la que la luminiscencia del marcador se inactiva por la partícula de nanooro si la segunda cadena se une a la primera cadena. Un ejemplo limitante para una sonda de este tipo es la sonda SmartFlare, que se puede obtener de Merck Millipore (Merck kgaA, Darmstadt, Alemania). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido biciatenario mencionado anteriormente se caracteriza por una longitud de

menos de 35 bases, en particular por una longitud de 18 a 30 bases.

En ciertas realizaciones, la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada es una sonda de ácido nucleico peptídico, en la que una nucleobase se reemplaza por un colorante luminiscente (de fluorescencia o fosforescencia) tras la unión o

5 hibridación de la sonda a la secuencia del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada. Dicho colorante se conoce como colorante intercalante, cuyos ejemplos no limitantes abarcan un colorante tal como colorante naranja de tiazol o un colorante amarillo de oxazol. Dichas sondas también se conocen como sondas de 10 intercalación forzada. Se describen ejemplos de dichas sondas en el documento WO 2006/072368 A2. En ciertas 15 realizaciones, la sonda de ácido nucleico peptídico mencionada anteriormente se caracteriza por una longitud de menos de 20 bases, en particular por una longitud de 18 nucleótidos.

En ciertas realizaciones, la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada es una sonda de ácido peptídico, en la que una 20 nucleobase o un monómero de ácido peptídico se reemplaza por un colorante luminiscente tras la unión de la sonda o la hibridación con una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada.

15 En determinadas realizaciones, la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada es una sonda de ácido nucleico, en la que una nucleobase se reemplaza por un colorante naranja de tiazol o un colorante amarillo de oxazol.

20 En ciertas realizaciones, la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada es un oligómero que comprende monómeros de ácido nucleico y monómeros de ácido péptido, en la que al menos uno de los monómeros se reemplaza por un colorante luminiscente tras la unión de la sonda o la hibridación, en particular mediante un colorante naranja de tiazol o un 25 colorante amarillo de oxazol.

En ciertas realizaciones, la etapa de aislamiento de ácido nucleico comprende las etapas de:

30 a. aislar linfocitos T de la muestra tumoral y aislar ácidos nucleicos de los linfocitos T, y/o

35 b. conducir una reacción de amplificación de ácido nucleico que amplifica específicamente secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T.

35 En ciertas realizaciones, se prepara una suspensión de células a partir de la muestra tumoral, en la que la suspensión celular comprende células tumorales de la muestra tumoral y, en particular, linfocitos T que infiltraron el tumor. Dicha suspensión celular puede prepararse a partir de la muestra tumoral mediante, por ejemplo, el sistema gentleMACS de Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania.

40 En ciertas realizaciones, se aíslan linfocitos T CD3+ de la muestra tumoral o la suspensión celular y, opcionalmente, de la muestra no tumoral, y/o la muestra de sangre, en los que se evalúan o comparan en particular frecuencias de clonotipos entre las células aisladas entre la muestra tumoral o la suspensión celular y la muestra no tumoral y/o la muestra de sangre.

45 En ciertas realizaciones, se aíslan linfocitos T CD4+ de la muestra tumoral o la suspensión celular y, opcionalmente, de la muestra no tumoral, y/o la muestra de sangre, en los que se evalúan o comparan en particular frecuencias de clonotipos entre las células aisladas entre la muestra tumoral o la suspensión celular y la muestra no tumoral y/o la muestra de sangre.

50 En ciertas realizaciones, se aíslan linfocitos T CD8+ de la muestra tumoral o la suspensión celular y, opcionalmente, de la muestra no tumoral, y/o la muestra de sangre, en los que se evalúan o comparan en particular frecuencias de clonotipos entre las células aisladas entre la muestra tumoral o la suspensión celular y la muestra no tumoral y/o la muestra de sangre.

55 En ciertas realizaciones, se aíslan linfocitos T que comprenden un marcador de activación de linfocitos T o que secretan interferón gamma o TNF alfa de la muestra tumoral o la suspensión celular y, opcionalmente, de la muestra no tumoral, y/o la muestra de sangre, en los que en particular se evalúan o comparan frecuencias de los clonotipos entre las células aisladas entre la muestra tumoral o la suspensión celular y la muestra no tumoral y/o la muestra de sangre, y en los que en particular los linfocitos T se tiñen con un ligando específicamente reactivo que capaz de unirse a un marcador de activación de linfocitos T, interferón gamma o TNF alfa con una constante de disociación de 10^{-7} , 10^{-8} o 10^{-9} mol/l o menos, o con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse específicamente con un ARNm que codifica el marcador de activación, interferón gamma o TNF alfa y se aíslan los linfocitos T teñidos.

En ciertas realizaciones, se tiñen linfocitos T aislados de la muestra tumoral con un ligando específico que se une a un marcador de activación de linfocitos T.

65 En ciertas realizaciones, se someten linfocitos T aislados de la muestra tumoral a una etapa de expansión, en los

que los linfocitos T se expanden en condiciones de cultivo celular.

En ciertas realizaciones, los linfocitos T se tiñen antes de aislarse con un ligando específicamente reactivo que es capaz de unirse a un marcador de la activación de linfocitos T con una constante de disociación de 10^{-7} , 10^{-8} o 10^{-9} mol/l o menos y se aíslan los linfocitos T teñidos.

5 Un ligando de acuerdo con la invención puede ser cualquier molécula que se une a una molécula diana o analito con alta afinidad y especificidad. Un ligando de este tipo puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula de tipo anticuerpo o una molécula de aptámero de ácido nucleico de 10 a 75 nucleótidos de longitud, cualquiera de los cuales se une a la molécula diana.

10 Un fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, que es el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o un fragmento variable monocatenario, que es una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo conectado por un enlazador peptídico. Una molécula de tipo anticuerpo puede ser 15 una proteína de repetición, tal como una proteína de repetición de anquirina diseñada (Molecular Partners, Zürich).

20 También pueden desarrollarse ligandos adecuados de acuerdo con el aspecto anterior de la invención mediante métodos tales como la visualización de fagos, la visualización de ribosomas o SELEX, en los que el polipeptido o los oligonucleótidos se seleccionan debido a su afinidad de unión a una diana de interés. Adicionalmente, la afinidad de unión de un ligando identificado puede mejorarse mediante ciclos de evolución de la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos, y la selección de los inhibidores evolucionados puede efectuarse basándose en la afinidad requerida.

25 En ciertas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T se selecciona entre LAG3, OX40, CD107a, CD154, PD-1, B7-H, VISTA, un miembro de Butirofilina, una proteína similar a Butirofilina, CD69 y CD137. En ciertas realizaciones, el marcador de activación de linfocitos T es la secreción de interferón gamma o TNF alfa. En particular, pueden aislarse linfocitos T que secretan interferón gamma y/o TNF alfa con, por ejemplo, el Ensayo de Secreción de IFN-γ o el Ensayo de Tinción de Citocina Intracelular de IFN gamma y TNF alfa de Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania.

30 30 En ciertas realizaciones, los linfocitos T aislados mencionados anteriormente se agotan de linfocitos T reguladores CD25+ y/o linfocitos T reguladores Foxp3+ antes de la etapa de aislamiento, en los que la preparación de ácido nucleico se aísla de las células aisladas o antes de conducir la amplificación de ácido nucleico anteriormente mencionada. En particular, los linfocitos T reguladores CD25+ y/o los linfocitos T reguladores Foxp3+ se agotan mediante la tinción de las células anteriormente mencionadas con un anticuerpo anti-CD25 o con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con un ácido nucleico que codifica al menos parcialmente CD25 o Foxp3 y la clasificación de las tinciones células, por ejemplo, mediante un método de citometría de flujo.

40 En ciertas realizaciones, se prepara una suspensión celular a partir de la muestra tumoral, en la que la suspensión celular comprende células tumorales de la muestra tumoral y linfocitos T que infiltraron el tumor, se aíslan linfocitos T CD154+ de la suspensión celular, se aíslan ácidos nucleicos de los linfocitos T CD154+ aislados y se obtiene una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de los ácidos nucleicos aislados. Preferentemente, los linfocitos T CD154+ están marcadas con un anticuerpo anti-CD154 que se une a un marcador óptico tal como un fluoróforo o a una partícula magnética o perla, y las células marcadas se aíslan por medio de 45 citometría de flujo o separación magnética. Ventajosamente, debido a la presencia de antígenos tumorales en la suspensión celular, no se necesita estimulación adicional, por ejemplo, en forma de antígenos, fragmentos de antígenos o células presentadoras de antígenos. Adicionalmente, tampoco es necesario el uso de un anticuerpo anti-CD40 para evitar una regulación a la baja de linfocitos T CD154+. La fracción restante de la suspensión celular puede procesarse adicionalmente como se ha descrito anteriormente.

50 50 En ciertas realizaciones, la etapa de aislamiento, en la que los linfocitos T específicos de tumor se aíslan de la preparación de linfocitos, va seguida de una etapa de expansión, en la que los linfocitos T aislados se expanden en condiciones de cultivo celular.

55 En particular, los linfocitos T específicos de tumor aislados pueden comprender o consisten en de uno a veinte clonotipos diferentes. En ciertas realizaciones, los linfocitos T específicos de tumor aislados comprenden o consisten en cinco, diez, quince o veinte clonotipos diferentes. Ventajosamente, los linfocitos T específicos de tumor aislados se caracterizan por una alta afinidad y reactividad para el tumor o las células tumorales del paciente.

60 60 Los linfocitos T que comprenden o exponen un marcador de activación de linfocitos T y/o secretan interferón gamma o TNF alfa pueden aislarse de la preparación de linfocitos T específicos de tumor aislados de la preparación de linfocitos o de la preparación de linfocitos T expandidos, en la que en particular los linfocitos T se tiñen para determinar un marcador de activación de linfocitos T y/o para determinar la secreción de interferón gamma o TNF alfa, y las células teñidas se aíslan, produciendo una preparación de linfocitos T específicos de tumor activados.

65 65 La preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención o la preparación de linfocitos T expandidos

también pueden cultivarse conjuntamente con una suspensión celular del tumor autólogo del paciente, y los linfocitos T que comprenden o exponen un marcador de activación de linfocitos T y/o secretan interferón gamma o TNF alfa pueden aislarse a partir de las preparaciones de linfocitos T mencionadas anteriormente que producen la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados.

5 Dicha preparación de linfocitos T activados se caracteriza en particular por linfocitos T con una alta reactividad tumoral.

10 En ciertas realizaciones, los linfocitos T CD4+ se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados.

15 En ciertas realizaciones, los linfocitos T CD8+ se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados.

20 En ciertas realizaciones, los linfocitos T de memoria centrales CCR7+ CD62L+, en particular los linfocitos T CCR7+ CD62L+ CD45RO+, más en particular los linfocitos T CCR7+ CD62L+ CD45RO+ CD45RA-, se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados, produciendo una preparación de linfocitos T de memoria centrales específicos de tumor.

25 En ciertas realizaciones, los linfocitos T de memoria centrales CD4+ CCR7+ CD62L+, en particular los linfocitos T CD4+ CCR7+ CD62L+ CD45RO+, más en particular los linfocitos T CD4+ CCR7+ CD62L+ CD45RO+ CD45RA-, se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados produciendo una preparación de linfocitos T CD4+ de memoria centrales específicos de tumor.

30 En ciertas realizaciones, los linfocitos T de memoria centrales CD8+ CCR7+ CD62L+, en particular los linfocitos T CD8+ CCR7+ CD62L+ CD45RO+, más en particular los linfocitos T CD8+ CCR7+ CD62L+ CD45RO+ CD45RA-, se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados produciendo una preparación de linfocitos T CD8+ de memoria centrales específicos de tumor.

35 En ciertas realizaciones, los linfocitos T de memoria efectores CCR7- CD62-, en particular los linfocitos T CCR7- CD62L- CD45RO+ más en particular los linfocitos T CCR7- CD62L- CD45RP+ CD45RA-, se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados produciendo una preparación de linfocitos T de memoria efectores específicos de tumor.

40 En determinadas realizaciones, los linfocitos T de memoria efectores CD4+CCR7- CD62, en particular los linfocitos T CD4+ CCR7- CD62L- CD45RO+, más en particular los linfocitos T CD4+ CCR7- CD62L- CD45RP+ CD45RA-, se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados produciendo una preparación de linfocitos T CD4+ de memoria efectores específicos de tumor.

45 En ciertas realizaciones, los linfocitos T de memoria CD8+ CCR7- CD62, en particular los linfocitos T CD8+ CCR7- CD62L- CD45RO+, más en particular los linfocitos T CD8+ CCR7- CD62L- CD45RP+ CD45RA-, se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados produciendo una preparación de linfocitos T CD8+ de memoria efectores específicos de tumor.

50 En ciertas realizaciones, los linfocitos T reguladores CD25+ y/o Foxp3+ se aíslan de la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o de la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados produciendo una preparación de linfocitos T reguladores específicos de tumor.

55 En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos T específicos de tumor de la invención, la preparación de linfocitos T expandidos o la preparación de linfocitos T específicos de tumor activados se agotan de linfocitos T reguladores CD25+ y/o linfocitos T reguladores Foxp3+, en particular antes de la etapa de expansión. Ventajosamente, la preparación de linfocitos T específicos de tumor resultante se caracteriza por un aumento de la reactividad tumoral y una mayor capacidad de proliferación debido a la ausencia de linfocitos T reguladores supresores específicos de tumor.

60 En particular, la reactividad tumoral de la preparación de linfocitos T específicos de tumor puede confirmarse mediante:

- cultivo conjunto de al menos una alícuota de cualquiera de las preparaciones de linfocitos T específicos de tumor mencionadas anteriormente de la invención, en particular una alícuota de los linfocitos T específicos de tumor que se aíslan de la preparación de linfocitos en las etapas de aislamiento, con una suspensión celular del tumor autólogo del paciente o un lisado del tumor autólogo junto con células presentadoras de antígeno autólogo del paciente, y
- determinación de la cantidad de interferón gamma o TNF alfa producidos por la preparación de linfocitos T en presencia de la suspensión celular, y/o determinar el nivel de un marcador de activación de linfocitos T en la preparación de linfocitos T en presencia de la suspensión celular, determinando en particular el nivel de OX40, CD107a, CD137, CD154, LAG3, PD-1, B7-H4, PD-1, un miembro de Butirofilina, una proteína similar a butirofilina y/o CD69.

En particular, una preparación de linfocitos T específicos de tumor caracterizada por la secreción de interferón gamma o TNF alfa y/o la expresión o expresión aumentada de un marcador de activación de linfocitos T se considera una preparación de linfocitos T específicos de tumor activados.

En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor está comprendida dentro de una secuencia de ácido nucleico que codifica la región CDR3 de una cadena del receptor de linfocitos T humano, en particular la cadena alfa o la cadena beta del receptor de linfocitos T humano.

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor está comprendida dentro o es la región CDR3 de una cadena del receptor de linfocitos T humano, en particular la cadena alfa o la cadena beta del receptor de linfocitos T humano.

En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico específica de tumor está comprendida dentro de un ARN. En ciertas realizaciones, el ARNm codifica una secuencia de aminoácidos comprendida dentro de la región CDR3 de la cadena alfa o la cadena beta del receptor de linfocitos T humano.

En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos se trata con un agente que aumenta el nivel de transcripto de ARNm de RLT antes de ponerse en contacto con la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada. Ventajosamente, el aumento del nivel de ARNm de RLT mejora la relación señal/ruido para la detección específica de los clonotipos específicos de tumor deseados.

En ciertas realizaciones, la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada se caracteriza por una temperatura de hibridación diana óptima de no más de 45 °C en condiciones fisiológicas del medio de hibridación tal como el citoplasma de linfocitos T. Ventajosamente, la temperatura de hibridación óptima se encuentra dentro de la temperatura de cultivo óptima para la preparación de linfocitos. En ciertas realizaciones, la temperatura de hibridación óptima está entre 20 °C y 37 °C.

De acuerdo con un aspecto alternativo de la invención, se proporciona un método para fabricar un receptor de linfocitos T específicos de tumor artificial. El método comprende las etapas de:

- proporcionar una cualquiera de las preparaciones de linfocitos T específicos de tumor de la invención mediante el método de la invención, proporcionando en particular una preparación de linfocitos T específicos de tumor activados;
- aislar un linfocito T específico de tumor individual de la preparación de linfocitos T específicos de tumor;
- determinar las regiones CDR3 de ambas subunidades del receptor de linfocitos T del linfocito T específico de tumor individual aislado;
- preparar un receptor de linfocitos T artificial que comprende las regiones CDR3 determinadas de ambas subunidades.

En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos T artificial comprende un resto, mediante el cual puede aislarse el receptor. En ciertas realizaciones, el receptor artificial comprende las regiones CDR3 de la cadena alfa y la cadena beta. En ciertas realizaciones, el receptor artificial comprende las regiones CDR3 de la cadena gamma y la cadena delta. En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos T artificial está comprendido dentro de un tetrámero de receptores de linfocitos T, en el que al menos uno o todos los monómeros comprenden las regiones CDR3 determinadas.

En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos T artificial se prepara recombinantemente, en el que un ácido nucleico que codifica el receptor de linfocitos T artificial se introduce en una célula hospedadora y se expresa produciendo el receptor de linfocitos T artificial. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico está bajo el control de un

promotor operable en las células hospedadoras. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es una célula CD3+ humana. Dicha célula CD3+ que comprende el receptor de linfocitos T artificial puede usarse para la transferencia adoptiva, en particular para tratar el cáncer. En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos T artificial está funcionalmente expuesto en la superficie de la célula hospedadora.

5 Además, se desvela un método para aislar células que llevan un antígeno específico de tumor. El método comprende las etapas de:

- proporcionar una preparación de linfocitos T específicos de tumor mediante el método de la invención,

10 - aislar un linfocito T específico de tumor individual de la preparación de linfocitos T específicos de tumor;

- determinar las regiones CDR3 de ambas subunidades del receptor de linfocitos T del linfocito T específico de tumor individual aislado;

15 - preparar un receptor de linfocitos T artificial que comprende las regiones CDR3 determinadas de ambas subunidades, en el que el receptor de linfocitos T artificial comprende un resto, mediante el cual el receptor de linfocitos T artificial puede aislarse selectivamente,

20 - poner en contacto el receptor de linfocitos T artificial con células que llevan antígenos,

- aislar células que se unen al receptor artificial.

25 En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos T del linfocito T individual específico de tumor aislado comprende una cadena alfa y una cadena beta, en el que se determina la región CDR3 de ambas cadenas. En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos T del linfocito T específico de tumor individual aislado comprende una cadena gamma y una cadena delta, en el que se determina la región CDR3 de ambas cadenas.

30 En ciertas realizaciones, el resto es una biotina o una perla magnética. En ciertas realizaciones, las células que se han de aislar se obtienen de la sangre de un sujeto. En ciertas realizaciones, se identifica el antígeno que es reconocido por el receptor de linfocitos T artificial de al menos una de las células aisladas, en particular mediante espectroscopía de masas.

35 Además, se desvela un método para enriquecer, en particular, aislar, un clonotipo de linfocitos T de interés caracterizado por una secuencia específica de ácido nucleico o de aminoácidos del receptor de linfocitos T. El método comprende las etapas de

- proporcionar una preparación de linfocitos que comprende el clonotipo de linfocito T de interés,

40 - separar dicha preparación de linfocitos en una pluralidad de fracciones en una etapa de separación,

- expandir las células comprendidas dentro de dicha pluralidad de fracciones en condiciones de cultivo celular en una etapa de expansión, y,

45 - seleccionar al menos una fracción de dicha pluralidad de fracción que comprende dicha secuencia específica de ácido nucleico o de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una etapa de selección.

50 En particular, la preparación de linfocitos se separa en la pluralidad de fracciones de tal manera que no todas las fracciones de la pluralidad, preferentemente menos de la mitad de la pluralidad, más preferentemente menos del 10 por ciento de la pluralidad, aún más preferentemente menos del 5 por ciento, lo más preferentemente menos del 1 por ciento, comprende la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada. Tal separación se puede lograr limitando el número de células por fracción de la pluralidad.

55 En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos se proporciona poniendo en contacto una preparación de linfocitos inicial que comprende el clonotipo de linfocitos T de interés con un ligando específicamente reactivo que se puede unir a una secuencia de aminoácidos comprendida dentro del segmento V del receptor de linfocitos T que se corresponde con la secuencia seleccionada de ácido nucleico o de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor, en donde el ligando está unido a un marcador detectable, los linfocitos T que llevan el marcador detectable se aíslan de la preparación de linfocitos inicial produciendo la preparación de linfocitos descrita anteriormente que está destinada a separarse de acuerdo con el aspecto anterior de la invención.

60 En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos o la preparación inicial de linfocitos es proporcionada por una muestra obtenida de un paciente. En ciertas realizaciones, la muestra obtenida del paciente es una muestra tumoral, una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal, en particular, una muestra de sangre, más en particular, una muestra de sangre periférica.

En ciertas realizaciones, cada una de las fracciones de la pluralidad comprende no más de 10^5 células, preferentemente, no más de 10^4 células, más preferentemente no más de 10^3 células, incluso más preferentemente no más de 10^2 células.

5 En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos se separa en al menos 96 fracciones, preferentemente en 96, en donde cada una de las fracciones comprende no más de 10^5 células.

En ciertas realizaciones, la preparación de linfocitos se separa en 96 fracciones a 384 fracciones.

10 En ciertas realizaciones, la etapa de selección comprende obtener secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de fracción e identificar la fracción que comprende dicha secuencia de ácido nucleico seleccionada del receptor de linfocitos T específicos de tumor, en donde, en particular, las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T se obtienen mediante amplificación, en particular, mediante PCR.

15 En ciertas realizaciones, las fracciones que comprenden la secuencia seleccionada del receptor de linfocitos T específicos de tumor se identifican mediante una reacción de amplificación con cebadores que hibridan de manera específica con al menos una parte del ácido nucleico seleccionado del receptor de linfocitos T específicos de tumores, en donde, en particular, las fracciones que no comprenden la secuencia de ácido nucleico seleccionada del receptor de linfocitos T específico de tumor no presenta un producto de amplificación.

20 En ciertas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T se obtienen de una alícuota de células comprendidas con la respectiva fracción o del sobrenadante de la respectiva fracción.

25 En ciertas realizaciones, la etapa de selección comprende poner en contacto las fracciones de la pluralidad con una sonda de ácido nucleico que se une de manera específica a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del receptor de linfocitos T específicos de tumor, en donde la sonda de ácido nucleico se une a un marcador detectable, y seleccionar al menos una fracción de la pluralidad que comprende linfocitos T que llevan el marcador detectable.

30 En ciertas realizaciones, el método para el enriquecimiento adicional comprende

- una segunda etapa de separación, en donde la fracción seleccionada se separa en una segunda pluralidad de fracción,

35 - una segunda etapa de expansión, en donde la célula comprendida con la segunda pluralidad de fracción se expande en condiciones de cultivo celular, y

- una segunda etapa de selección, en donde se selecciona al menos una fracción de la segunda pluralidad de fracción que comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del receptor de linfocitos T específicos de tumor,

40 En particular, la etapa de separación, la etapa de expansión y la etapa de selección se pueden repetir con cada fracción recientemente seleccionada que comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del receptor de linfocitos T específicos de tumor. Preferentemente, la etapa de separación, la etapa de expansión y la etapa de selección se repiten de una a cuatro veces.

45 En ciertas realizaciones, el método para enriquecer, particularmente aislar, un clonotipo de linfocitos T de interés caracterizado por una secuencia específica de receptor de linfocitos T se realiza en una micromatriz, en la que la preparación de linfocitos se separa en diferentes compartimentos de la micromatriz que comprende las fracciones de la pluralidad mencionada anteriormente. Tal micromatriz puede ser una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de pocillos, o una microplaca microfluídica que comprende una pluralidad de cavidades y/o de canales, o una matriz, en donde las diferentes fracciones están embebidas por una matriz que dificulta la difusión libre de las células de las fracciones.

55 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para fabricar un receptor de linfocitos T específicos de tumor artificial. El método comprende las etapas de:

- preparar un receptor de linfocitos T artificial que comprende el oligopéptido o el polipéptido de la invención, en particular, en ambas subunidades.

60 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, a partir de los cuales pueden extraerse realizaciones y ventajas adicionales. Estos ejemplos tienen por objeto ilustrar la invención, pero no limitar su alcance.

Descripción de las figuras

65 Fig. 1 muestra en A: esquema de la región CDR3 de la cadena alfa del receptor de linfocitos T humano. B: Igual que

A, pero para la cadena beta del receptor de linfocitos T humano. C: Principio de amplificación de la región genómica que contiene CDR3. Los cebadores de PCR son específicos para los repertorios de segmentos V/J y amplifican regiones pequeñas de los segmentos V y J con la región CDR3 entre ellos.

5 Fig. 2 muestra un diagrama de flujo que representa los principios del método de la invención.

Fig. 3 muestra cómo la relación de LIT y linfocitos T no tumorales separa los LIT en clonotipos de linfocitos T altamente reactivos frente a tumor y menos altamente reactivos frente a tumor. La línea punteada representa las relaciones tumor frente a no tumor (T/nT), las líneas punteadas y continuas muestran las frecuencias de los clones de linfocitos T que llevan/expresan marcadores de activación específicos (PD-1, IFNgamma). Para una relación umbral $T/nT > 5$ casi todos los clones reactivos frente a tumor se predicen correctamente, para $T/nT > 20$ se seleccionan 2 clones y se predicen correctamente como reactivos frente a tumor.

Ejemplos

15 Ejemplo 1: Identificación de linfocitos T específicos de tumor y secuencias específicas de tumor mediante análisis comparativo de secuencias

20 Se usó tecnología de secuenciación de última generación (NGS, por sus siglas en inglés) para secuenciar muchos miles de regiones CDR3 de RLT beta (un RLT corresponde a un linfocito T) por muestra en alto rendimiento, por lo que se generaron bibliotecas de secuenciación para la región CDR3 de RLT beta humano. Las secuencias resultantes se analizaron mediante herramientas bioinformáticas y el resultado final por muestra es una tabla que enumera los clonotipos respectivos (tipos de linfocitos T con el mismo RLT beta).

25 La región CDR3 del receptor de linfocitos T está determinada por los segmentos V y J constantes (véase la Fig. 1) y las regiones altamente variables entre ellos. Debido a esta estructura, una y la misma secuencia de aminoácidos de CDR3 puede ser codificada por múltiples secuencias de nucleótidos, que pueden estar incluso compuestas por segmentos V/J distintos. La aparición de múltiples (> 1) secuencias de CDR3 de nucleótidos por una secuencia de aminoácidos entre el conjunto de linfocitos T específicos de tumor y linfocitos T potencialmente reactivos frente a tumor (LTRT) es una fuerte pista de que los linfocitos T con la secuencia de aminoácidos CDR3 respectiva son reactivos con respecto a las células tumorales.

30 Siempre se añaden secuencias de CDR3, con esta propiedad, a la selección final de secuencias de CDR3, si su puntuación (véase la tabla 1 a continuación) es mayor o igual a 1000.

35 Esquema de puntuación para la identificación de linfocitos T específicos de tumor (LTET) mediante perfiles de secuencia y análisis bioinformático.

40 El método se basa en un sistema de puntuación que se proporciona a continuación (Tabla 1), donde una o varias muestras se toman y analizan en paralelo y las mejores puntuaciones se obtienen para clonotipos con proporciones respectivas de frecuencias por tipo de muestra. En general, se identificaron linfocitos infiltrantes de tumores mediante las siguientes series de etapas de análisis:

45 a) Se realiza una secuenciación de última generación (NGS) a partir de muestras tumorales. Las muestras tumorales se definen como una muestra o un conjunto de muestras replicadas tomadas de tejido tumoral. En la práctica, el material para analizar los RLT se obtiene mediante ya sea

50 i.) Selección de biopsias distintas o diferentes áreas de una biopsia. Esto puede ayudarse mediante tinción inmunohistoquímica, en la que en particular se tiñen inmunohistológicamente linfocitos T reactivas frente a tumor (LTRT) con, preferentemente, marcadores de activación de linfocitos T tales como LAG3, OX40, CD107a o CD137 y se seleccionan regiones teñidas para la extracción de ADN.

55 ii.) Lisis de tejido tumoral, por ejemplo, mediante tecnologías basadas en perlas para la preparación de suspensiones de células individuales como punto de partida para el análisis de RLT. Las suspensiones de células individuales pueden separarse en diferentes subconjuntos de linfocitos T, por ejemplo, subconjuntos de CD4+ y CD8+.

Además, las muestras tumorales pueden almacenarse en condiciones de conservación celular como recurso para materiales celulares.

60 b) Se seleccionan muestras no tumorales del mismo paciente de tejido/regiones adyacentes a la muestra tumoral, si es posible por duplicado, cuando sea posible a partir de distintas zonas de tejido y se realiza un análisis de secuencia NGS de a y/o β -RLT/CDR3.

65 c) Se toman muestras de sangre (componentes celulares) del mismo paciente: se aislaron componentes celulares mediante fraccionamiento hematológico convencional a partir de sangre completa, se realizó un análisis de secuencia NGS de a y/o β -RLT/CDR3 y se calcularon los perfiles de RLT.

5 d) Se toman suero, plasma u otros fluidos/tejidos biológicos sin células del mismo paciente, opcionalmente mediante la retirada adicional de componentes celulares mediante fraccionamiento hematológico convencional. La presencia de ADN específico de RLT en muestras sin células puede ser un fuerte indicio de procesos apoptóticos contra linfocitos T. Si se encuentra una cantidad significativa de clonotipos (véase a continuación, Tabla 1) en muestras sin células y tumores, la puntuación contribuye a la tabla de puntuación (Tabla 1).

10 e) Opcionalmente, se usan 2 o más puntos temporales en el transcurso del tratamiento/diagnóstico del paciente para el cribado, es decir, se toman muestras en puntos temporales distintos de sangre, etc. (véase 2. a-d.). Esto permitirá, por ejemplo, el diagnóstico de recaída o la detección de nuevas CTPT dirigidas contra la metástasis, etc.

Principios del cálculo del clonotipo (agrupamiento de secuencia) a partir de datos de NGS

15 a. Se secuencian regiones CDR3 de la cadena RLT α y la cadena RLT β con tecnología NGS. Se usó un método de PCR de 2 etapas (como se describe en el documento WO 2014/096394 A1) con cebadores RLT α o RLT β que se unen específicamente a los segmentos V y J adyacentes a la región CDR3. Se usó ADN como material de partida para el proceso de NGS.

20 b. Por muestra generalmente se produce un gran número ($> 10^5$) de lecturas (secuencias de nucleótidos) mediante NGS, las lecturas se combinan en agrupamientos de secuencias de nucleótidos prácticamente idénticas, el número de lecturas por grupo determina la frecuencia de ese agrupamiento, donde la frecuencia de un agrupamiento se mide en porcentaje de lecturas de esta muestra que cae en este agrupamiento.

25 c. El agrupamiento es muy conservador y funciona en dos rondas: en una primera etapa, todas las lecturas con el 100 % de identidad de secuencia de nucleótidos se cuentan como 1 agrupamiento con la secuencia de agrupamiento que es idéntica a la secuencia de lectura. En la segunda etapa, los agrupamientos se comparan entre sí y aquellos con

30 i. no más de un desapareamiento de 1 pb y
ii. cuando un agrupamiento (agrupamiento A) tiene al menos 20x más lecturas que el otro agrupamiento (agrupamiento B)

35 se combinan y se consideran idénticos al agrupamiento A Los agrupamientos de secuencias de nucleótidos se consideran equivalentes a clonotipos.

40 d. los agrupamientos de secuencias de nucleótidos se traducen en secuencias de aminoácidos (péptidos) y se tabulan. Cada agrupamiento se considera un clonotipo con una frecuencia como se define en (1.b). La frecuencia es una medida directa de la frecuencia del linfocito T respectivo en la muestra.

45 e. Los agrupamientos (clonotipos) que comparten una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica se combinan en tipos agrupados, la frecuencia de un tipo agrupado es idéntica a la suma de las frecuencias de los agrupamientos de secuencias de nucleótidos que son elementos de dicho tipo agrupado.

45 La clasificación de la puntuación de LTET (linfocitos T específicos de tumor) se proporciona en números de 4 dígitos 1011, 1010, 1001, 1000 (del más alto al más bajo), todos los demás casos están excluidos.

Dentro de las columnas la puntuación se define como sigue

50 Tabla 1. La tabla de puntuación para la selección de los mejores clonotipos de LTET.

Secuencia de nucleótidos de CDR3 de linfocito T	Puntuación de LTET	A: tejido tumoral	B: tejido no tumoral	C: sangre celular	D: ADN sin células
Sec 1	1011	1	0	1	1
Sec 2	1110	1	1	1	0
Sec 3	1001	1	0	0	1

55 Dentro de cada columna (1 columna por tipo de tejido) se proporcionan puntuaciones binarias simples por secuencia de nucleótidos CDR3 (Sec 1,2,3,...): '1' significa que la secuencia de ADN CDR3 respectiva aparece, '0' significa que está ausente o se encuentra en niveles bajos. La definición precisa se proporciona a continuación. Las puntuaciones binarias se combinan con una puntuación LTET de 4 dígitos, como se muestra en la Tabla 2. La clasificación de puntuaciones LTET aceptadas está dada por su orden natural: 1011, 1010, 1001, 1000 (de mejor a peor), todas las demás puntuaciones están excluidas. El esquema de puntuación de LTET también incluye casos donde, por ejemplo, no hay muestra de sangre, es decir, las columnas C y D se llenarían con '0' o donde solo hay muestras tumorales, es decir, las columnas B, C y D se llenarían con '0'. Las puntuaciones binarias por columna (= tipo de tejido) se definen como se indica a continuación:

A: puntuación = 1: la secuencia (sec 1,2,...) está entre los 100 clonotipos principales (ordenados por su frecuencia de mayor a menor) y muestra un marco de lectura abierto intacto, es decir, no se encuentran codones de parada ni desplazamientos del marco de lectura; de lo contrario, puntuación = 0

5 B: puntuación = 0: la secuencia (Sec 1,2,3,...) está ausente en la muestra no tumoral o se encuentra idéntica en las muestras no tumorales, pero con una relación $R = \text{pepB}/\text{pepA}$ menor o igual a 0,2, 0,15, 0,1 o 0,05, si pepB es la frecuencia en muestras no tumorales y pepA es la frecuencia en la muestra tumoral. En todos los demás casos, puntuación = 1.

10 C: puntuación = 1: la frecuencia de la secuencia Sec 1,2,3,... es menor que la frecuencia de la secuencia respectiva en el tejido tumoral (A), de lo contrario, puntuación = 0

15 D: puntuación = 1: la frecuencia de la secuencia Sec 1,2,3,... es superior al 0,001 % de todas las secuencias derivadas de ADN sin células, de lo contrario, puntuación = 0

20 E: Para secuencias de CDR3 Sec 1,2,3,... ya seleccionadas por su puntuación LTET (véase A-D anteriormente), opcionalmente, puede aplicarse el siguiente filtro adicional: si las secuencias de aminoácidos CDR3 idénticas a A (muestra tumoral) están codificadas por diferentes secuencias de nucleótidos de CDR3 Sec 1, 2, 3... esto es indicativo de recombinación convergente y antígenos tumorales altamente inmunógenos. Los clonotipos con esta propiedad reciben la puntuación más alta de LTET = 1011.

25 F: Para secuencias de CDR3 Sec 1,2,3,... seleccionadas por su puntuación de LTET (véase A-D anterior), opcionalmente se aplica el siguiente filtro adicional: secuencias de CDR3 traducidas en secuencias de aminoácidos de A (muestra tumoral) pueden compararse entre sí mediante alineamiento de proteínas (expansión) usando matrices de sustitución de aminoácidos como BLOSUM80 o BLOSUM62. Las secuencias de aminoácidos que son muy similares con un desapareamiento máximo de 1 se clasifican en agrupamientos de similitud y cada miembro (Sec 1,2,3...) del agrupamiento de similitud recibe la misma puntuación de LTET que la mejor secuencia de CDR3 en ese agrupamiento de similitud.

30 Dentro de cada agrupamiento de puntuación 1011, 1010, 1001, 1000 (del mejor al peor) las secuencias de nucleótidos CDR3 se ordenan por su frecuencia de mayor a menor y a partir de la lista ordenada final se seleccionan las 1-100 secuencias de nucleótidos CDR3 superiores como conjunto de candidatas para las siguientes etapas. En otras realizaciones, se seleccionan las 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 secuencias de CDR3 superiores. Pero se prefieren 35 20.

Los clonotipos de mejor puntuación (hasta 20) se almacenan como

40 a. molde para la síntesis de marcadores fluorescentes
 b. molde para la síntesis de nuevos linfocitos T específicos de tumor mediante transferencia génica.

45 La muestra tumoral mencionada anteriormente puede ser una sola muestra o un conjunto de muestras del paciente. Por tanto, puede analizarse una pluralidad de muestras tumorales de un paciente como se ha descrito anteriormente. Los clonotipos que aparecieron en diferentes muestras tumorales se prefieren a los clonotipos que aparecen en la menor parte de muestras tumorales.

Ejemplo 2: Identificación de la secuencia diana

50 Una vez que se identifican las secuencias de ácido nucleico de RLT de los clones de linfocitos T de interés, son necesarias etapas adicionales para definir las secuencias diana ideales que pueden usarse para la detección y el enriquecimiento de dichos clones de linfocitos T. En primer lugar, la secuencia genómica específica se usa para generar una secuencia de ARNm madura al menos parcial con el fin de descartar cualquier parte intrónica que no pueda servir como diana para el reconocimiento específico mediante sondas en células vivas. Dichas secuencias de ARNm maduras clonales se comparan después con el transcriptoma completo que incluye el ARNm de RLT maduro de todos los otros linfocitos T que no pertenecen a los clones de interés con el fin de identificar solo secuencias específicas de diana. En particular, principalmente las regiones CDR3 del ARNm de RLT son diferentes en cuanto al clonotipo y muestran diferencia con otros transcritos en la célula también. Las secuencias específicas de clones diana pueden analizarse adicionalmente para determinar las estructuras que interfieren con la hibridación de la sonda. Esto puede realizarse experimentalmente comprobando la eficiencia de hibridación o mediante análisis computacional usando herramientas tales como MFold o UNAFold (<http://mfold.rna.albany.edu/>). Se prefiere elegir la región con el delta G más alto (más cercano a cero) para el diseño de la sonda.

Ejemplo 3: Sondas para la detección in vivo

65 Una vez identificadas las secuencias de ADN específicas de diana de los clones de interés, pueden diseñarse

sondas para la detección en linfocitos T vivos. Pueden usarse diferentes formatos de sonda. Sin embargo, dependiendo de la longitud de la región específica de diana, pueden elegirse sondas multipartitas o sondas de oligonucleótidos individuales. Pueden diseñarse balizas moleculares para hibridarse con el ARN diana a una temperatura compatible con el cultivo celular. Hay disponibles en el mercado paquetes de software tales como 5 Beacon Designer™ desarrollado por PREMIER Biosoft International (www.premierbiosoft.com). Las sondas moleculares pueden tener un par de colorantes conjugados en su mayoría terminales que se apagan debido a la formación de un tallo mientras no se hibridan con una diana. Tras la hibridación de la diana, el tallo terminal se abre y los colorantes no se apagan. Sin embargo, en un entorno complejo como el citoplasma de las células vivas, la 10 interacción inespecífica con las proteínas puede abrir el tallo dando como resultado señales positivas falsas. Con el fin de potenciar la especificidad de una baliza molecular, puede diseñarse una segunda baliza molecular para que se hibride directamente adyacente a la primera baliza molecular como una sonda bipartita. Si los extremos de ambas balizas se hibridan específicamente dentro de una distancia de hasta cuatro nucleótidos, puede usarse una señal de 15 FRET altamente específica entre los colorantes adyacentes para detectar el evento de hibridación. También puede conseguirse un reconocimiento multipartito con sondas no estructuradas que no sean en un formato de baliza molecular. El llamado SmartFlare es un nuevo formato de sonda que combina las propiedades de las partículas de nanoro de potenciación de la transfección celular y la extinción de los colorantes fluorescentes que se inmovilizan 20 en las proximidades de la superficie del oro. Por tanto, es suficiente una sonda simple complementaria a una secuencia diana dada que lleve un único colorante fluorescente. El colorante de la sonda se inactiva eficazmente cuando se hibrida con otro ácido nucleico que está anclado a una nanopartícula de oro. Tras la transfección en una célula viva, la sonda puede desplazarse por hibridación específica a su secuencia diana complementaria, volviéndose de este modo fluorescente por desprendimiento de la nanopartícula. Las sondas de intercalación 25 forzada (FITprobes, documento WO 2006/072368 A2) son un formato aún más deseable. La intercalación de ciertos colorantes entre nucleobases del dúplex sonda-diana formado restringe la flexibilidad de torsión de dos sistemas de anillos heterocíclicos de dichos colorantes. Como resultado, las sondas FIT muestran fuertes potenciaciones de la fluorescencia tras la hibridación. Se ha informado que una sonda FIT con naranja de tiazol (TO, por sus siglas en 30 inglés) produce una señal en presencia de ADN o ARN complementario con al menos 25 veces la potenciación de la intensidad de fluorescencia. Más recientemente, se descubrió que las sondas PAD FIT marcadas con fluoróforo son extremadamente sensibles y brillantes para la detección sensible de ADN o ARN complementario en potenciaciones de intensidad de fluorescencia de hasta 450 veces. A diferencia de las balizas moleculares basadas en ADN 35 existentes, esta forma de sonda basada en ANP no requiere una secuencia de tallo para forzar la comunicación colorante-colorante. Se ha demostrado que las sondas FIT que contienen amarillo de oxazol (YO, por sus siglas en inglés) discriminan desapareamientos de bases individuales por atenuación de la fluorescencia y pueden usarse si deben detectarse polimorfismos de nucleótidos individuales (PNI) específicamente. Además, se ha demostrado que la adición de restos de lisina C-terminales permite la captación en células vivas sin la necesidad de ningún otro reactivo de transfección. Aunque las sondas FIT se han publicado originalmente como sondas basadas en ANP, 40 también se han desarrollado sondas FIT basadas en ADN y ANB. Se descubrió que las sondas de ADN FIT con combinaciones de colorantes dobles tales como TO y YO son muy específicas *in vivo* superando el brillo de las balizas moleculares. Además, los denominados mixmeros de ANP y ADN ya están disponibles en el mercado. Por tanto, es posible optimizar la especificidad, la solubilidad y la temperatura de fusión para generar sondas FIT para la detección fluorescente eficiente de clones de linfocitos T vivos.

Dependiendo de su composición de bases y tipo de nucleótido, serán óptimas diferentes longitudes para el reconocimiento citoplásmico del ARNm de RLT diana. Se prefiere que la parte de hibridación específica de la diana de las sondas de ANP convencionales sea más corta de 20 bases y las sondas de ADN convencionales tengan 45 menos de 35 bases. Sin embargo, existen muchas modificaciones no convencionales que pueden usarse para elevar o disminuir la especificidad y/o la temperatura de fusión de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, los sitios abásicos y los ácidos nucleicos desbloqueados pueden disminuir la temperatura de fusión y aumentar la especificidad. ANB tiene una temperatura de fusión más alta que el ADN y está protegido contra la degradación de por nucleasas. Incluso las bases modificadas, como la inosina, que pueden emparejarse con tres de las cuatro 50 bases naturales, pueden usarse para afinar el reconocimiento intracelular.

Debido a la gran complejidad de las estructuras de ácido nucleico que pueden surgir *in vivo*, se prefiere elegir sondas monopartitas que no dependan de estructuras para su funcionalidad. Provista de la región diana específica preferida identificada anteriormente en comparación con otra transcripción celular y accesibilidad estructural, la 55 persona experta sabría cómo diseñar una sonda apropiada usando herramientas de diseño bioinformáticas respectivas.

Ejemplo 4: Mecanismos de captación de la sonda

60 Los ácidos nucleicos pueden captarse en células vivas mediante una multitud de mecanismos. El proceso se denomina transfección, cuando las células eucarióticas son abordadas mediante un mecanismo no vírico. Hay disponibles tres métodos generales de transfección denominados transfección química, transfección no química y transfección basada en partículas. Los métodos de transfección química hacen uso de productos químicos adicionales que facilitan la captación celular. Dichos aditivos pueden ser sales, polímeros, liposomas y 65 nanopartículas o una mezcla de los mismos.

La eficacia de los métodos de transfección depende en gran medida del tamaño y la forma de los nucleótidos, así como del tipo celular. Los ácidos nucleicos pequeños pueden transfectarse de manera eficaz mediante compuestos de formación de poros. La permeabilización reversible de estreptolisina-O (SLO) es un método eficaz para administrar ácidos nucleicos pequeños, tales como ARNip o balizas moleculares y es compatible con los linfocitos T.

5 Además, los linfocitos T han sido transfectados de manera eficaz mediante conjugados de nanopartículas de oro con sondas marcadas tales como SmartFlares. Además, se usó Lipofectamina® eficazmente para la transfección de oligonucleótidos pequeños tales como ARNip o ARN antisentido en los linfocitos T. Especialmente, el ANP puede alargarse de forma simple mediante unos pocos restos de lisina para conseguir la captación celular sin ningún reactivo de transfección adicional. Los métodos preferidos de transfección no química son la magnetofección y la 10 electroporación. Se prefiere más el exprimido de células que se demostró que proporcionaba una gama de materiales, tales como nanotubos de carbono, proteínas y ARNip, a más de 20 tipos de células, incluidas células madre embrionarias y células inmunitarias vírgenes. La plataforma microfluídica de Sqz Biotechnologies Co. permite 15 el alto rendimiento y la transfección eficiente de linfocitos T sin la necesidad de reactivos de transfección.

15 **Ejemplo 5: Aumento de señales específicas:**

El nivel de transcritos de ARNm de RLT en una célula puede aumentarse con el fin de proporcionar una relación de señal a ruido más alta para la detección específica preferentemente mediante sondas monopartitas. Los inventores han descubierto que un tratamiento anterior de una noche de linfocitos T con 10 U/ml de IL-2 puede aumentar el 20 nivel de transcripción del ARNm de RLT. Como alternativa, el nivel de ARNm de RLT puede aumentarse con cicloheximida. El inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX) induce un aumento de 20 veces en la acumulación de transcritos de RLT-alfa maduros sin un aumento concomitante en la transcripción del gen RLT-alfa, lo que indica que CHX invierte los eventos nucleares postranscripcionales que evitan la acumulación de ARNm de 25 RLT-alfa maduro. CHX también induce transcritos de RLT-beta de longitud completa más de 90 veces, mientras que la transcripción del gen de RLT-beta aumenta solo de 2 a 4 veces (Wilkinson y McLeod *EMBO J.*, enero de 1988; 7 (1): 101-109). Puesto que la inhibición por CHX resultó ser reversible, se prefiere realizar solo un breve período de 30 incubación suficiente para elevar el nivel de ARNm para la detección mediante sondas en un factor de 10.

Otra alternativa es activar los linfocitos T e incubar las células activadas durante un período de 24 h, doblando de 30 este modo la cantidad de ARNm para la detección específica.

Ejemplo 6: Método en matriz para el aislamiento específico de secuencia de clonotipos de linfocitos T

Pueden aislarse clonotipos de linfocitos T, en particular los clonotipos específicos de tumor de la invención, mediante 35 el siguiente enfoque iterativo que comprende diluir linfocitos T en pocillos positivos para clonotipos y repetir el método hasta que se genera una población de linfocitos T homogénea que comprende el clonotipo deseado.

El ensayo basado en ácido nucleico puede realizarse mediante hibridación con sonda directa en células o 40 amplificación específica de secuencias diana para la detección. La hibridación con sonda directa puede realizarse usando células muertas (análisis por microscopio, exploración de pocillos de microtitulación o FACS) o células vivas (sondas FIT, etc., análisis por microscopio, exploración de pocillos de microtitulación o FACS). La reacción de amplificación es preferentemente una (RT-)PCR en muestras en matriz.

45 Las muestras adecuadas comprenden, sin limitación, ácido nucleico extracelular (sin células), el sobrenadante o la superficie de matriz puede comprender un ácido nucleico sin células que puede usarse para la identificación específica y sensible sin destruir las células valiosas. Esto puede permitir un aislamiento más rápido de las células diana sin la necesidad de división celular, lisado en bruto derivado de una alícuota de la matriz (pocillo o posición), ADN nuclear purificado, ARNm purificado.

50 Los diferentes formatos de matriz que son compatibles con el método comprenden, sin restricción:

- pocillos de microtitulación (al menos 2 pocillos, preferentemente más de 6 pocillos, más preferentemente entre 128 y 384 pocillos)
- matriz embebida. Las células están preferentemente embebidas en una matriz que impide la difusión libre de las células y, por tanto, conserva las coordenadas de un clon depositado inicialmente. La matriz preferentemente comprende polímeros tales como agarosa, gelatina o poliacrilamida.
- matriz aleatoria. La matriz aleatoria no depende de una cuadrícula preformada para contener muestras.
- microfluídica. Una matriz microfluídica puede estar formada específicamente por canales y otras estructuras que pueden permitir etapas de manipulación que comprenden la distribución celular inicial, el lavado, la dilución, la expansión y la recuperación de células y/o ácidos nucleicos. Un ejemplo no limitante de dicha matriz microfluídica se muestra en <http://www.biomedsrc.org/research/cell-tissue-microingenieria/living-cell-array>.

65 Dependiendo de la frecuencia del clonotipo diana en una muestra, puede realizarse una dilución limitante apropiada

para asegurar que no haya más de un clonotipo presente en una alícuota diluida o pocillo dado. Incluso las células individuales pueden atraparse directamente en una matriz con micropocillos comunicantes por dielectroforesis (el proceso mediante el cual se impide que las partículas dieléctricas, tales como las células vivas, en un campo eléctrico no uniforme salgan de los micropocillos).

5 Las condiciones de cultivo pueden elegirse para optimizar la proliferación de las células. Esto puede comprender el cultivo conjunto con células alimentadoras que eviten la muerte celular o la falta de crecimiento de células individuales que se diluyeron a partir de una muestra. Además, pueden incluirse citocinas y nutrientes en los medios para potenciar adicionalmente la división celular. Dependiendo del tipo de linfocitos T deseado, pueden aplicarse 10 diferentes condiciones óptimas. En algunos casos, puede ser ventajoso desencadenar o potenciar la producción de exosomas mediante linfocitos T diana como fuente de ácido nucleico sin células para el ensayo, en la que la producción de exosomas mencionada anteriormente puede desencadenarse por activación de dichos linfocitos T por células presentadoras de antígeno o poniéndolos en contacto con IL-2.

15 Puesto que una población de 10^6 linfocitos T aislados de una muestra de sangre contiene 1 linfocito T de interés con una CDR3 identificada anteriormente, puede emplearse un procedimiento de selección en matriz. Una máquina atípica de RT-PCR puede manejar placas de microtitulación de 384 pocillos. Los 10^6 linfocitos T pueden diluirse igualmente en 384 pocillos, sumando aproximadamente 3×10^3 células por pocillo, una de las cuales alberga el 20 clonotipo de interés. Después de 4 divisiones, cada célula estaría presente en 8 copias, por lo que el clon de interés está idealmente presente en la misma relación $1:3 \times 10^3$ que antes. Se retira la mitad del sobrenadante y el ADN (o ARNm) se purifica mientras se mantienen las coordenadas en la alícuota de la placa de microtitulación 384. (Para métodos de purificación de ADN o ARN automatizados, consulte en el presente documento: <https://www.promeaa.de/resources/tools/automated-methods/>). Las muestras se someten a RT-PCR para detectar las 25 coordenadas del clonotipo diana. Una vez que se conocen las coordenadas, la alícuota de las células vivas (4×10^4 células) de la coordenada se diluye en otra placa de 384 pocillos. Ahora hasta 4 pocillos pueden contener el clonotipo diana con una relación de aproximadamente 1:30. Después de 4 divisiones celulares, los pocillos se criban nuevamente mediante PCR y la alícuota de pocillos positivos (4×120) puede diluirse de nuevo en una placa de microtitulación con dimensiones apropiadas para producir cultivos clonales. Todos los pocillos positivos pueden diluirse en una placa de 384 pocillos, incluso con la posible pérdida de algunas células diana. Después de otras 4 30 divisiones celulares, los clones positivos pueden identificarse rápidamente en una alícuota mediante RT-PCR u otros métodos basados en sondas. Con el fin de optimizar las condiciones de crecimiento, pueden usarse medios apropiados con citocinas y células alimentadoras (que pueden distinguirse fácilmente por antígenos de superficie).

35 En el caso de que haya más clones positivos en la muestra original de 1 millón de células, el procedimiento puede procesar más de éstas para tener una mayor probabilidad de obtener clonotipos proliferantes para la expansión.

La tasa de división celular y la capacidad de expansión de los clonotipos diana son limitantes para este procedimiento. Puede llevar 24-48 h que un linfocito T CD4+ se divida por primera vez *in vitro*, mientras que las divisiones posteriores suelen ocurrir mucho más rápido. Si una división de linfocitos T tarda 1 día, entonces el 40 procedimiento con 3 matrices llevará al menos 2 semanas. Sin embargo, para un tratamiento eficaz, la expansión anterior de los clonotipos es imprescindible. El método anterior favorece intrínsecamente el aislamiento de linfocitos T proliferativos. Si el sobrenadante sin células contiene ARNm de RLT-beta, entonces el aislamiento puede avanzar más rápidamente mediante el análisis no destructivo del sobrenadante.

45 **Ejemplo 7: Eficiencia de la predicción basada en secuencias de clonotipos de linfocitos T reactivos frente a tumores**

En la tabla 2 se representan a modo de ejemplo los 100 clonotipos más frecuentes (**NN**: el clonotipo no se pudo 50 medir en tejido no tumoral). Los 100 clonotipos más representativos son iguales a la SEQ ID 01 a 100. En las tablas 3, 4 y 5 se muestran los 5, 10 y 15 clonotipos más frecuentes, respectivamente, de LIT recién aislados de muestras tumorales de CPNM (columna E), caracterizadas por péptidos CDR3-beta únicos (columna A) y sus segmentos V y J flanqueantes (columnas B y C). El ensayo de secreción de IFNgamma después de la incubación conjunta de LIT CD4+ expandidos con células tumorales autólogas revela la presencia de un número significativo de clones CD8+ 55 claramente reactivos frente al tumor dentro de los 5, 10 y 15 superiores (columna H en la tabla 3-5, IFNgamma > 0,25).

En la tabla 3, se muestra que la región CDR3 (péptido) del receptor de linfocitos T beta se encuentra idéntica en 60 diferentes muestras del mismo paciente con el tumor (CPNM) para los 5 clonotipos CD8+ de LIT superiores. Los segmentos V y los segmentos J se indican de acuerdo con la nomenclatura IMGT. Las frecuencias CDR3 como porcentaje de lecturas de secuencia se proporcionan para las siguientes muestras: **SANGRE**: se extrajeron linfocitos T de sangre (CMSP). **LIT CD8+**: se extrajeron linfocitos T del tumor (LIT) y se clasificaron con respecto a CD8+. **CD8+ NO TUMORAL**: se tomaron muestras de tejido pulmonar distalmente del tumor y se extrajeron y se clasificaron linfocitos T (CD8+). **LIT CD4- PD1+**: se extrajeron linfocitos T del tumor, se agotaron con respecto a CD4 y se clasificaron mediante un anticuerpo específico de PD1, lo que da como resultado la fracción de linfocitos T citotóxicos activados. **IFNgamma CD4-**: los linfocitos T originalmente extraídos del tumor se mantuvieron en cultivo 65 durante 20 días, se cultivaron conjuntamente con células tumorales y se midió la secreción de IFNgamma mediante

un ensayo comercial, que muestra la activación de linfocitos T como medida directa de la reactividad tumoral. **LIT CD8⁺/CD8⁺ NO TUMORAL**: relación de frecuencias encontradas en LIT y muestras no tumorales (CD8⁺). Para relaciones > 5 (> 20) hay una clara prevalencia de clonotipos altamente reactivos frente a tumores como se muestra simultáneamente por las frecuencias de IFNgamma y PD1⁺.

5 La Tabla 4 muestra lo mismo que la Tabla 3, pero para los 10 primeros clonotipos LIT CD8⁺. Nuevamente, para las relaciones LIT CD8⁺/CD8⁺ NO TUMORAL > 5 (> 20) existe una clara prevalencia de clonotipos altamente reactivos frente a tumores como se muestra simultáneamente por las frecuencias de IFNgamma y PD1⁺.

10 La Tabla 5 muestra lo mismo que la Tabla 3, pero para los 15 primeros clonotipos de LIT CD8⁺. Nuevamente, para las relaciones LIT CD8⁺/CD8⁺ NO TUMORAL > 5 (> 20) existe una clara prevalencia de clonotipos altamente reactivos frente a tumores como se muestra simultáneamente por las frecuencias de IFNgamma y PD1⁺.

15 Estos clones reactivos frente a tumores de alta frecuencia pueden predecirse e identificarse aplicando la relación de frecuencias entre linfocitos T CD8⁺ tumorales y no tumorales (relación T/nT, columna I).

En la tabla 3, dentro de los 5 primeros, la relación T/nT > 20 identifica el clon 2, la relación > 5 los clones 1, 2 y 4. Por tanto, todos los clones reactivos frente a tumores dentro de los 5 primeros se identifican utilizando la relación T/nT.

20 En la tabla 4, dentro de los 10 primeros, la relación > 20 identifica los clones 2 y 7, la relación > 5 los clones 1, 2, 4 y 7 como reactivos frente a tumores.

25 En la tabla 5, dentro de los 15 primeros, la relación > 20 identifica los clones 2 y 7, la relación > 5 los clones 1, 2, 4, 11 y 12, que comprende todos los clones reactivos frente a tumores dentro de los 15 TIL CD8⁺ más frecuentes.

En la tabla 6 se muestra la comparación de 3 métodos de identificación de linfocitos T específicos de tumor para frecuencias de IFNgamma $> 0,25$: **a**) solo se usa tejido tumoral, es decir, todas las estadísticas se refieren a LIT solos, **b**) las frecuencias de LIT (CD8⁺) se comparan con linfocitos T (CD8⁺) de tejido no tumoral y solo se usan LIT con una relación tumoral/no tumoral > 20 , **c**) Las frecuencias LIT (CD8⁺) se comparan con los linfocitos T (CD8⁺) del tejido no tumoral y solo se usan los LIT con una relación tumoral/no tumoral > 5 . Es obvio que los mejores resultados en términos del número de linfocitos T reactivos frente al tumor y la intensidad de la señal de IFNy medida se alcanzan mediante las comparaciones de tejidos, preferentemente con una relación > 5 .

35 Para una selección de los 15 clonotipos superiores, la predicción de la reactividad tumoral se muestra bastante precisa en la figura 1: La regla de la relación T/nT > 5 separa los clones de linfocitos T eficientemente en altamente reactivos frente a tumores y menores reactivos frente a tumores. Para una relación T/nT > 20 , la predicción de la reactividad frente a tumores es correcta al 100 %, con el precio de perder una cantidad de clonotipos verdaderamente reactivos frente a tumores.

40 Ejemplo 8: Aislamiento específico de secuencia de RLT de clonotipos reactivos frente a tumores

La identificación de clonotipos reactivos frente a tumores caracterizados por secuencias específicas (CDR3beta, segmento Vbeta) abre el camino para estrategias específicas de secuencia para el enriquecimiento de clones reactivos frente a tumores.

45 6 semanas después de la resección del tumor (CPNM), se extrajo sangre del paciente y se prepararon las CMSP. Parte de las CMSP se secuencian para RLTbeta. Se incubó una alícuota de la preparación de CMSP con un anticuerpo Vbeta-30 específico para el clon 2 del paciente.

50 Los resultados se proporcionan en la Tabla 7 que muestra el enriquecimiento de los clones de linfocitos T deseados mediante clasificación específica de secuencia con anticuerpos específicos del segmento de Vbeta respectivos. **Péptido CDR3**: la región CDR3 (péptido) del receptor de linfocitos T beta. Los **segmentos V** y los **segmentos J** se indican de acuerdo con la nomenclatura IMGT. **LIT CD8⁺**: se trajeron linfocitos T del tumor (LIT) y se clasificaron con respecto a CD8⁺. **IFNgamma CD4⁺**: los linfocitos T originalmente extraídos del tumor se mantuvieron en cultivo durante 20 días, se cultivaron conjuntamente con células tumorales y se midió la secreción de IFNgamma mediante un ensayo comercial, que muestra la activación de los linfocitos T estimulados por los respectivos antígenos. **LIT CD4⁺ PD1⁺**: se trajeron linfocitos T del tumor, se agotaron con respecto a CD4 y se clasificaron mediante un anticuerpo específico de PD1, lo que da como resultado la fracción de linfocitos T citotóxicos activados. **LIT CD8⁺/CD8⁺ NO TUMORAL**: Relación de frecuencias encontrada en LIT y muestras no tumorales (CD8⁺). **Vbeta AB**: el anticuerpo específico del segmento específico Vbeta utilizado para la captura de clonotipos dedicados. **Frec. en la selección de Vbeta AB**: Frecuencia del clonotipo respectivo después de usar la separación por perlas con un anticuerpo específico de Vbeta. **Frec. en CMSP**: frecuencia del clonotipo respectivo en sangre periférica. **Factor de enriquecimiento**: la relación de frecuencias de clonotipos después de la separación por Vbeta-anticuerpo frente a la frecuencia en sangre periférica. Para el segundo clonotipo no hubo una frecuencia detectable en sangre periférica, de manera que el factor de enriquecimiento solo podía adivinarse mediante el empleo del umbral más bajo del

0,001 % como el valor más alto posible.

El clon 2 se midió en las CMSP del paciente con una frecuencia del 0,097 % (columna J). Usando el anticuerpo Vbeta-30 y la separación por perlas, la frecuencia se aumentó al 5,52 % (columna I). Este es un factor de enriquecimiento de 57,0, preparando el escenario para el aislamiento completo del clon con procedimientos convencionales de sangre periférica del paciente.

Métodos y materiales

10 Los siguientes experimentos fueron aprobados por el comité de ética de médicos de la cámara de Berlín (N.º Eth-62-15).

Iniciación y expansión de microcultivos linfocitos T a partir de fragmentos de tejido tumoral y pulmonar

15 Cada muestra de ensayo de tumor se disecó sin tejido normal circundante ni áreas necróticas. Se cortaron cubos de aproximadamente 1 g de tumor y tejido pulmonar normal en trozos pequeños que medían aproximadamente 2-3 mm en cada dimensión. Las biopsias de tumor cortadas (y también no tumorales) se sometieron a un sistema de disociación de tejido mecánico/enzimático comercial (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania), usando el kit de disociación tumoral (Miltenyi Biotech) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 20 Después de la disgregación GentleMACS, las suspensiones celulares se pasaron a través de filtros de 70 µm. Se tomaron alícuotas de células tumorales y se criopreservaron en DMSO al 10 % (Sigma-Aldrich) y FCS al 90 % (Life Technologies) para su uso posterior. La suspensión celular restante se sometió a centrifugación en gradiente de densidad usando un gradiente escalonado al 40 %/80 % de Percoll® (GE Healthcare Europe GmbH) en PBS/RPMI 1640. Los linfocitos T se recogieron de la interfase y se lavaron en medio completo (RPMI 1640, Lonza).

25 25 Posteriormente, los linfocitos T se colocaron en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos con 2 ml de medio de recuperación (RM) a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml. El RM consistía en RPMI 1640 complementado con HEPES 25 mM pH 7,2 y L-glutamina (Lonza), 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y β -mercaptoetanol 50 µM (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), suplementado con un 10 % de suero humano autólogo. Las placas se colocaron en una incubadora humidificada a 37 °C con un 5 % de CO₂ y se cultivaron durante la noche.

30 30 Al día siguiente, las células se recogieron y agruparon a partir de los pocillos y se separaron mediante el sistema MidiMACS basado en perlas magnéticas, usando columnas MicroBeads y LS CD4 y CD8 (Miltenyi Biotech), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El flujo continuo de los experimentos de CD4MicroBeads, es decir, las fracciones celulares agotadas de CD4 se usaron adicionalmente para rastrear clonotipos de CD8 LIT en experimentos de PD1 e INFgamma. Para la separación de clonotipos PD1+ se usaron PD-1 Microbeads (Miltenyi Biotech, selección positiva). Todas las fracciones celulares se cultivaron en medio completo (CM) a una densidad de $0,5-1 \times 10^6$ células/ml. El CM consistía en RPMI 1640 complementado con HEPES 25 mM, pH 7,2 y L-glutamina (Lonza), penicilina 100 IU/ml, estreptomicina 100 µg/ml, anfotericina B 2,5 mg/l (Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.) y β -mercaptoetanol 50 µM (ThermoFisher Scientific), complementado con un 10 % de suero de ternera fetal (FCS), más 3000 UI/ml de IL-2 humana recombinante (Miltenyi Biotec) y Dynabeads Human T Activator CD3/CD28 (Life Technologies) en una relación perla:linfocito T de 1:1. Las placas se colocaron en una incubadora humidificada a 37 °C con un 5 % de CO₂ y se cultivaron hasta el día 22. Cada segundo o tercer día, la mitad del medio se retiró y se reemplazó con medio recién preparado complementado con IL-2 fresca. Siempre que fuera necesario, las células se dividieron en pocillos duplicados mediante la adición de medio recién preparado complementado con IL-2 para mantener una densidad celular de $\approx 10^6$ células/ml. En la primera semana, los cultivos celulares se recogieron para la extracción de ADN y la preparación de la biblioteca de NGS, los LIT residuales se expandieron adicionalmente. Entre los días 14 y 18 se retiraron las Dynabeads, la concentración de IL2 en el medio se redujo a 1500 UI/ml y se reemplazó el FCS al 10 % por suero humano autólogo al 6 %.

Ensayo de secreción de interferón-gamma - Enrichamiento y detección de células

40 40 Para el ensayo de cultivo conjunto de tumor en el día 22, se omitió la IL-2 del medio. El cultivo conjunto se estableció con una relación 1:1 de LIT expandidos y células tumorales autólogas (10^5 LIT y 10^5 células tumorales autólogas por pocillo). Las células tumorales derivaban de la digestión tumoral inicial que se criopreservó en DMSO al 10 % (Sigma-Aldrich) y FCS al 90 % (Life Technologies) y se lavaron en RPMI 1640 antes de la adición. El cultivo conjunto se incubó en una incubadora humidificada durante 20 h a 37 °C antes de que las células se recogieran y se analizaran para determinar la producción de interferón gamma (IFNy) en un Kit de Ensayo y Detección de Secreción de IFNy (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células unidas a perlas se eluyeron y sedimentaron para el aislamiento de ADN genómico y la preparación de la biblioteca de NGS.

Enriquecimiento de células basado en el anticuerpo V-beta

45 45 65 Para el aislamiento de linfocitos T de sangre se incubaron 3 ml de sangre recién extraída con 5 volúmenes de tampón de lisis de eritrocitos (tampón EL, Qiagen) durante 15 minutos a 4 °C. Las células mononucleares se

5 sedimentaron en una centrífuga refrigerada a 400 g. Las células se lavaron varias veces con tampón EL y PBS y finalmente se marcaron con conjugado de anticuerpo anti-Vbeta 30-PE (Beckman Coulter, Brea, California, EE. UU.). Las células se marcaron indirectamente magnéticamente con MicroBeads anti-PE (Miltenyi Biotec) y se separaron en columnas MS usando el sistema de separación magnética MiniMACS siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células unidas a perlas se eluyeron y sedimentaron para el aislamiento de ADN genómico y la preparación de la biblioteca de NGS.

Aislamiento de ADN genómico

10 Se extrajo ADN genómico (ADNg) de materiales de tisulares usando el kit de tejido NucleoSpin® de Macherey-Nagel (Düren, Alemania). Se aisló ADNg de sangre a partir de 2-3 ml de sangre fresca con el Mini Kit de Sangre de ADN QIAamp® (Qiagen, Hilden, Alemania) o con el Kit Universal de ADN/ARN/ARNmi AllPrep® (Qiagen) siguiendo los protocolos del fabricante.

15 Cálculo de las frecuencias de clonotipos (agrupamiento de secuencia) a partir de datos de NGS

20 Se secuenciaron regiones CDR3 de la cadena RLT β con tecnología NGS (Illumina MiSEQ) siguiendo un método patentado de amplificación por PCR en dos etapas (como se desvela en el documento WO 2014/096394 A1) que usa cebadores de RLT β que se unen específicamente a los segmentos V y J adyacentes a la región CDR3. Se usó ADN genómico como material de partida para el proceso de NGS.

25 Por muestra, normalmente se produce un número grande ($> 10^5$) de lecturas emparejadas (secuencias de nucleótidos) mediante NGS. Los pares de lecturas se superponen normalmente en 40 a 80 bases y se combinan par de lectura por par de lectura con secuencias contiguas. Estas secuencias después se ensamblan en agrupamientos de secuencias de nucleótidos prácticamente idénticas, el número de lecturas por agrupamiento determina la frecuencia de ese agrupamiento, donde la frecuencia de un agrupamiento se mide en porcentaje de lecturas de esta muestra que cae en este agrupamiento.

30 El agrupamiento es muy conservador y funciona en dos rondas: en una primera etapa, todas las lecturas con el 100 % de identidad de secuencia de nucleótidos se cuentan como 1 agrupamiento con la secuencia de agrupamiento que es idéntica a la secuencia de lectura. En la segunda etapa, los agrupamientos se comparan entre sí y aquellos con

35 - no más de un desapareamiento de 1 pb y
 - cuando un agrupamiento (agrupamiento A) tiene al menos 20x más lecturas que el otro agrupamiento (agrupamiento B)

40 se combinan y se consideran idénticos al agrupamiento A. Los agrupamientos de secuencias de nucleótidos se consideran equivalentes a clonotipos.

45 Los agrupamientos de secuencias de nucleótidos se traducen en secuencias de aminoácidos (péptidos) y se tabulan. Cada agrupamiento se considera un clonotipo con una frecuencia como se ha definido anteriormente. La frecuencia es una medida directa de la frecuencia del linfocito T respectivo en la muestra.

Comparación de perfiles de secuencias de RLT entre muestras

50 Se compararon secuencias de aminoácidos de CDR3 de clonotipos entre muestras mediante un procedimiento de ensayo de identidad, donde solo se aceptan secuencias sin emparejamientos erróneos como una y la misma secuencia de aminoácidos de CDR3. El resultado de una comparación de múltiples muestras es una tabla con una secuencia de aminoácidos de CDR3 de RLT β compartida por una o más muestras por fila, cada muestra está representada por una columna que contiene las respectivas frecuencias de CDR3 en esa muestra. Las relaciones entre distintas muestras (que comparten la misma secuencia de aminoácidos CDR3) se calculan por relación de las frecuencias respectivas.

Tabla 2:

A	B	C	D	E	F	G	peptido CDR3	
							Segm V	Segm J
CASSYDRAEAEFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	3,660	0,407	8,993		
CANNRQDVGYTE	V30*01/**03/*05	J1-2*01	0,026	2,394	0,055	43,527		
CASSEGMMTEAFF	V5-5*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	2,330	1,461	1,595		
CASSPGEETQYE	V4-2*01/*02	J2-5*01	0,000	2,256	0,201	11,224		
CASSLQAYEQYE	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,608	1,786	1,016	1,758		
CASSPAGMMTEAFF	V7-3*01/*05	J1-1*01	0,035	1,417	3,386	0,418		
CAISDMTGSNYGYTF	V10-3*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,000	1,162	0,058	20,034		
CASSSGRDLLEYF	V5-6*01	J2-7*01	0,326	1,121	0,596	1,881		
CASSENGAAEIOYE	V18*01	J2-5*01	0,000	1,095	4,883	0,224		
CASSRLAGGTDIQQF	V7-3*01/*05	J2-3*01	0,564	0,950	2,477	0,384		
CASSSGVYEQFF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,898	0,128	7,016		
CASSSTGGSLLEFF	V28*01	J2-2*01	0,000	0,875	0,102	8,578		
CASSEAPPLYEQYF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-7*01	0,051	0,855	0,211	4,052		
CASSNDRAGLINEQFF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-1*01	0,352	0,846	0,739	1,145		
CATSDRLEQFF	V24-1*01	J2-1*01	0,127	0,822	0,113	7,274		
CASSLGYRYGIEAFF	V5-4*01/*02/*03/*04	J1-1*01	0,752	0,810	3,512	0,231		
CASSQDNGGYGTF	V4-1*01/*02	J1-2*01	0,000	0,803	0,148	5,426		
CASSQDSFYGTF	V4-1*01/*02	J1-2*01	0,232	0,800	0,195	4,103		
CASSAULDRYNGYTF	V5-1*01/*02	J1-2*01	0,000	0,782	0,807	0,969		
CASSLDRGGYEQYF	V4-1*01/*02	J2-7*01	0,000	0,754	0,140	5,386		
CARPPAGIPTDIFYF	V28*01	J2-3*01	0,000	0,731	0,000	NN		
CASSDQGHSNQBPQHF	V4-1*01/*02	J1-5*01	0,160	0,713	0,130	5,485		
CASSRPSFRVSEQFF	V4-1*01/*02	J2-1*01	0,464	0,704	1,214	0,580		
CASSLILAGASEQYF	V5-5*01/*02/*03	J2-7*01	0,343	0,665	0,392	1,696		
CASSSTQGENEOFF	V28*01	J2-1*01	0,874	0,614	3,060	0,201		
CASSLVRGNEQFF	V27*01	J2-1*01	0,068	0,609	0,189	3,222		
CASSLERSERPEQYF	V7-9*01-*07	J2-7*01	0,801	0,596	4,943	0,121		
CASTPFGNTIGELEF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-2*01	0,145	0,571	0,280	2,039		
CASNFBGFTREOYE	V5-6*01	J2-7*01	0,020	0,564	0,098	5,755		
CASSLRINYEQYF	V5-5*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,557	0,307	1,814		

Tabla 2: continuación:

CASSSERPEATINKEFF	V4-1*01/*02	J1-4*01	0,000	0,012	46,333
CASSSEWDTEAFF	V27*01	J1-1*01	0,041	0,472	4,816
CANAKGTEAFF	V30*01/**03/*05	J1-1*01	0,000	0,471	31,400
CANAKGTEAFF	V14*01/*02	J1-1*01	0,302	0,457	0,684
CASSSEGRGYEQYEF	V5-4*01/*02/*03/*04	J2-7*01	0,000	0,417	41,700
CASSSEGRGYEQYEF	V4-1*01/*02	J2-7*01	0,070	0,387	3,721
CASSSEGRGYEQYEF	V4-1*01/*02	J1-1*01	0,000	0,351	1,219
CASSSEGTGGSSTRNEQF	V6-1*01/V6-5*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-1*01	0,000	0,350	19,444
CATITGTSYEQYF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,284	NN
CASSSMEASGYTF	V5-6*01	J1-2*01	0,012	0,282	1,621
CATITGTSYEQYF	V4-1*01/*02	J2-7*01	0,000	0,280	2,154
CASSSQTGTGSEQYF	V27*01	J2-7*01	0,000	0,278	0,321
CASSSQTGTGSEQYF	V16*01/**02/*03	J1-1*01	0,000	0,273	NN
CASSSQTGTGSEQYF	V7-9*01-*07	J2-5*01	0,214	0,262	0,258
CASSSTEAPEQYEF	V5-8*01/*02	J2-7*01	0,000	0,252	0,977
CASSSTAGGLVEQYEF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,267	0,249	1,324
CATTOAGTENTEAFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	0,246	0,055
CASSSEGOEGTEQYEF	V4-1*01/*02	J2-7*01	0,030	0,242	11,000
CASSSEGEGETQYF	V4-1*01/*02	J2-5*01	0,026	0,237	12,474
CASSSYGELNNMOTDTQ	V7-6*01/*02	J2-3*01	0,000	0,236	0,027
CASSSYRDSSSEQYEF	V9*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,229	NN
CASSSYTAEPFGEQQFF	V6-2*01/**02/*03/-3*01	J2-1*01	0,078	0,229	1,151
CASSSYSETMNGYTF	V5-1*01/*02	J1-2*01	0,014	0,223	2,299
CASSSERSTIGLEFF	V4-2*01/*02	J2-2*01	0,000	0,223	8,741
CASSSYWGGINTEAFF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J1-1*01	0,000	0,219	1,159
CASSSIRDGEAFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	0,217	1,507
CASSSOLSGGFTEQYF	V4-1*01/*02	J2-7*01	0,000	0,216	1,403
CAYWKEYGYTF	V30*01/**03/*05	J1-2*01	0,000	0,213	NN
CANTWGGGENEQYF	V30*01/**03/*05	J2-7*01	0,194	0,213	2,536
CATIDLHRTPDINTEAF	V24-1*01	J1-1*01	0,038	0,207	1,865
CASSSSQGDGTIDQYF	V7-9*01-*07	J2-3*01	0,000	0,202	1,496
CASSSEGPNTYEQYF	V7-6*01/*02	J2-7*01	0,021	0,201	16,750
CASSSEEEGYTF	V7-2*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,605	0,199	0,110
CASSSDBVAEQYF	V4-3*01/*02/*03/*04	J2-7*01	0,000	0,198	NN
CASSSIRGKTSYEQYF	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,017	0,191	0,985
CASSSSKNEQFF	V27*01	J2-1*01	0,000	0,188	2,212

Tabla 2: continuación:

CAVNQAEWGGTQYF	V27*01	0,108	0,180	0,060	3,000
CAWSFGASGGTETQYF	V30*01/**03/**05	J2-5*01	0,000	0,180	1,364
CASSQRAPAYGTYF	V4-1*01/*02	J1-2*01	0,000	0,177	0,039
V3-1*01/*02	V27*01	J2-1*01	0,000	0,169	0,129
CASSLILSGGADIQYF	V7-6*01/*02	J2-3*01	0,011	0,166	0,560
CASSRGPNYEQYF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,043	0,158	0,172
CASSIDINNEQF	V24-1*01	J2-1*01	0,077	0,155	0,163
CATSDLIDFDRYDGYTF	V7-6*01/*02	J1-2*01	0,000	0,153	0,000
CASSPLITGMQFF	V19*01/*02/*03	J2-1*01	0,000	0,147	0,098
CASIWRLEMNTAFFF	V27*01	J1-1*01	0,000	0,145	0,260
CASSSTVAGEQYF	V4-2*01/*02	J2-7*01	0,444	0,145	1,494
CASPERITNTGELFF	V27*01	J2-2*01	0,065	0,143	0,164
CASTRSVGAGTEAFF	V14*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	0,140	0,085
CASSPGTDGGSLGSPLH	V27*01	J1-6*01	0,000	0,137	0,015
CASSWDSSSIEQYF	V6-2*01/**02/**03/-3*01	J2-7*01	0,000	0,134	0,029
CASSEPLGEEKLFF	V6-1*01/V6--5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J1-4*01	0,000	0,134	4,621
CASSQAGIHINGTYE	V14*01/*02	J1-2*01	0,000	0,134	0,271
CASSIAGGGPGETQYF	V19*01/*02/*03	J2-5*01	0,000	0,130	0,079
CASSQVFDRDGYTF	V4-3*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,000	0,126	0,088
CASSQGQALGYEQYF	V4-1*01/*02	J2-7*01	0,000	0,123	0,194
CASSEYLEVORTQYF	V25-1*01	J2-5*01	0,027	0,120	0,090
V5-6*01	V25-1*01	J2-1*01	0,000	0,120	0,101
CASSEYLEVORTQYF	V10-3*01/*02/*03/*04	J2-1*01	0,000	0,119	0,129
CAISESKDRPSSNNEQF	V5-4*01/*02/*03/*04	J2-7*01	0,000	0,119	0,119
CASSQKGNQIYF	V14*01/*02	J2-4*01	0,017	0,118	0,046
CNTGLGGQEQYF	V24-1*01	J2-7*01	0,099	0,118	0,070
CASSLTDGYTF	V7-2*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,306	0,118	1,023
CASSLTDGYTF	V7-2*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,083	0,117	0,176
CASTPGSYREDOYF	V5-1*01/*02	J2-5*01	0,055	0,116	0,491
CASGTDIEPSIEQYF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,115	0,017
CAIPSSGANTLTF	V10-3*01/*02/*03/*04	J2-6*01	0,000	0,112	0,000
CASSIVGGPHEQYF	V7-9*01-*07	J2-7*01	0,000	0,111	0,000
CASSQAGTGMQFF	V6-1*01/V6--5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-1*01	0,000	0,111	0,054
CASSQKDRGYTF	V4-2*01/*02	J1-2*01	0,000	0,109	10,900

Tabla 3:

Péptido CDR3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Segm V	Segm J	SANGRE	LIT CD8*	CD8* no tumoral	LIT CD4* PDI*	IFNgamma CD4*	LIT CD8+/ CD8* no tumoral	Puntuación de LTET	
CASSVDRGAEAFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	3,660	0,407	1,066	2,742	8,993	1010	
CANNKQVDGYTF	V30*01/**03/**05	J1-2*01	0,026	2,394	0,055	1,231	0,740	43,527	1010	
CASSFGVNTTEAFF	V5-5*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	2,330	1,461	0,533	0,089	1,595	1110	
CASSPDETOYF	V4-2*01/*02	J2-5*01	0,000	2,256	0,201	0,971	1,127	11,224	1010	
CASSLGQAYEQYF	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,608	1,786	1,016	0,115	0,045	1,758	1110	

Tabla 4:

Péptido CDR3	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Segm V	Segm J	SANGRE	LIT CD8*	CD8* no tumoral	LIT CD4* PD1*	IFNgamma CD4*	LIT CD8* CD8* no tumoral	Puntuación de LTET	
CASSVDRGAEAFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	3,660	0,407	1,066	2,742	8,993	1010	
CARNKQVDGTYIF	V30*01/**03/*05	J1-2*01	0,026	2,394	0,055	1,231	0,740	43,527	1010	
CASSFGVMTTEAFF	V5-5*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	2,330	1,461	0,533	0,089	1,595	1110	
CASSPDGETQYF	V4-2*01/*02	J2-5*01	0,000	2,256	0,201	0,971	1,127	11,224	1010	
CASSLGQAYEQYF	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,608	1,786	1,016	0,115	0,045	1,758	1110	
CASSPVAGMNTTEAFF	V7-3*01/*05	J1-1*01	0,035	1,417	3,386	0,212	0,244	0,418	1110	
CASISDWTGSNYGYTE	V10-3*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,000	1,162	0,058	0,393	2,382	20,034	1010	
CASSGRGDLLEQYF	V5-6*01	J2-7*01	0,326	1,121	0,596	0,092	0,000	1,881	1110	
CASSETGAAETQYF	V18*01	J2-5*01	0,000	1,095	4,883	0,246	0,097	0,224	1110	
CASSRLAGGTIDQYF	V7-3*01/*05	J2-3*01	0,564	0,950	2,477	0,052	0,040	0,384	1110	

Tabla 5:

Péptido CDR3	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Segm V	Segm J	SANGRE	LIT CD8 ⁺	CD8 ⁺ no tumoral	LIT CD4 ⁺ PDI ⁺	IFNgamma CD4	LIT CD8 ⁺ / CD8 ⁺ no tumoral	Puntuación de LTET
CASSVDRGAAFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	3,660	0,407	1,066	2,742	8,993	1010
CARNKQVQDGTYF	V30*01/**03/*05	J1-2*01	0,026	2,394	0,055	1,231	0,740	43,527	1010
CASSEFGVMTNTAFFF	V5-5*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	2,330	1,461	0,533	0,089	1,595	1110
CASSPDGETQYF	V4-2*01/*02	J2-5*01	0,000	2,256	0,201	0,971	1,127	11,224	1010
CASSLQAYEQYF	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,608	1,786	1,016	0,115	0,045	1,758	1110
CASSPVAGMNTAFFF	V7-3*01/*05	J1-1*01	0,035	1,417	3,386	0,212	0,244	0,418	1110
CASISDWIGNSNYGYF	V10-3*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,000	1,162	0,058	0,393	2,382	20,034	1010
CASSGRGDLLEQYF	V5-6*01	J2-7*01	0,326	1,121	0,596	0,092	0,000	1,881	1110
CASSETGAAETQYF	V18*01	J2-5*01	0,000	1,095	4,883	0,246	0,097	0,224	1110
CASSRLAGGTDTQYF	V7-3*01/*05	J2-3*01	0,564	0,950	2,477	0,052	0,040	0,384	1110
CASSSGGLVYEQYF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,898	0,128	0,217	0,888	7,016	1010
CASSTGGGLGLEFF	V28*01	J2-2*01	0,000	0,875	0,102	1,050	0,651	8,578	1010
CASSEAPPLYEQYF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01	J2-7*01	0,051	0,855	0,211	0,000	0,000	4,052	1110
CASSNDRAGLINEQFF	/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-1*01	0,352	0,846	0,739	0,017	0,000	1,145	1110
CATSDGRILEQFFF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01	J2-1*01	0,127	0,822	0,113	0,725	0,000	7,274	1010

Tabla 6:

mediana de IFNgamma	clones reactivos frente a tumores	clones no reactivos	porcentaje de clones reactivos frente a tumores
5 primeros LIT			
a. no se usó ningún tejido no tumoral	0,74	3	60%
b. relación tumor/no tumor > 20	0,74	1	100%
c. relación tumor/no tumor > 5	1,13	3	100%
10 primeros LIT			
a. no se usó ningún tejido no tumoral	0,17	4	40%
b. relación tumor/no tumor > 20	1,56	2	100%
c. relación tumor/no tumor > 5	1,76	4	100%
15 primeros LIT			
a. no se usó ningún tejido no tumoral	0,10	6	40%
b. relación tumor/no tumor > 20	1,56	2	100%
c. relación tumor/no tumor > 5	0,89	7	88%

Tabla 7:

Péptido CDR3	Segm V	Segm J	LIT CD8+	IFNgamma CD4. PD1+	LIT CD4- PD1+	LIT CD8/NO TUMORAL	AB Vbeta	Frec. en Vbeta AB	Frec. en CMSP	Factor de enriquecimiento
CAWN KQVDIG	V30*01/**03/*05	J1-2*01	2,394	0,740	1,231	43,527	V30-AB	5,525	0,097	57,019
YTF										
CAWAKGTEAFFV30*01/**03/*05	J1-1*01	0,471	0,703	0,254	31,400	V30-AB	1,294	Sin valor		> 1000

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar un receptor artificial de linfocitos T específicos de tumor, que comprende las etapas de:

5 - proporcionar una preparación de linfocitos T específica de tumor mediante las etapas de:

 a. seleccionar clones de linfocitos T específicos de tumor:

10 - proporcionando una muestra tumoral obtenida de un paciente;

 - aislando una preparación de ácido nucleico de dicha muestra tumoral en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;

15 - obteniendo una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de dicha preparación de ácido nucleico o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;

20 - seleccionando una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una etapa de selección de secuencia;

 b. clasificar clones de linfocitos T específicos de tumor:

25 - proporcionando una preparación de linfocitos obtenida de dicho paciente;

 - aislando células que comprenden dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada o dicha secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada de dicha preparación de linfocitos en una etapa de aislamiento;

30 - aislar un linfocito T específico de tumor individual de dicha preparación de linfocitos T específicos de tumor;

 - determinar las regiones de CDR3 de ambas subunidades de dicho receptor e linfocitos T de linfocito T específico de tumor individual aislado; y

 - preparar un receptor de linfocitos T artificial que comprende dichas regiones de CDR3 determinadas de ambas subunidades.

2. El método para aislar células que llevan un antígeno específico de tumor, que comprende las etapas de:

35 - proporcionar una preparación de linfocitos T específicos de tumor mediante las etapas de:

 a. seleccionar clones de linfocitos T específicos de tumor:

40 - proporcionando una muestra de tumor obtenida de un paciente;

 - aislando una preparación de ácido nucleico de dicha muestra de tumor en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;

45 - obteniendo una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha preparación de ácido nucleico o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;

50 - seleccionando una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una etapa de selección de secuencia;

 b. clasificar los clones de linfocitos T específicos de tumor:

55 - proporcionando una preparación de linfocitos obtenida de dicho paciente;

 - aislando células que comprenden dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor o dicha secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor de dicha preparación de linfocitos en una etapa de aislamiento;

60 - aislar un linfocito T específico de tumor individual de dicha preparación de linfocitos T específicos de tumor;

 - determinar las regiones de CDR3 de ambas subunidades del receptor de linfocitos T de dichos linfocitos T específicos de tumor individuales;

 - preparar un receptor de linfocitos T que comprende las regiones de CDR3 determinadas de ambas subunidades, en donde el receptor de linfocitos T artificial comprende un resto, mediante el cual, el receptor de linfocitos T artificial se puede aislar de manera selectiva,

65 - poner en contacto el receptor de linfocitos T artificial con las células que llevan los antígenos, y

 - aislar las células que se unen al receptor artificial.

3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de aislamiento comprende las etapas de:

5 - poner en contacto dicha preparación de linfocitos con un ligando específicamente reactivo que es capaz de unirse a una secuencia de aminoácidos comprendida dentro de la región V del receptor de linfocitos T que corresponde a dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada o a dicha secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T seleccionada, en donde dicho ligando se une a un marcador detectable y en donde en particular dicho ligando se une a dicha secuencia de aminoácidos con una constante de disociación de 10^{-7} , 10^{-8} o 10^{-9} mol/l o menos, y

10 - aislar linfocitos T que llevan dicho marcador detectable de dicha preparación de linfocitos.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha etapa de aislamiento comprende;

15 a. las etapas de poner en contacto dicha preparación de linfocitos con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada, en donde dicha sonda de ácido nucleico está unida a un marcador detectable; y aislar los linfocitos T que llevan dicho marcador detectable de dicha preparación de linfocitos, o

20 b. una etapa de separación, en la que dicha preparación de linfocitos se separa en una pluralidad de fracciones, una etapa de expansión, en la que se expanden células comprendidas dentro de dicha pluralidad de fracciones en condiciones de cultivo celular, y una etapa de selección, en la que se selecciona al menos una fracción de dicha pluralidad de fracciones que comprende dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor o dicha secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada, y dicha etapa de aislamiento comprende además opcionalmente repetir dicha etapa de separación, dicha etapa de expansión y dicha etapa de selección con dicha al menos una fracción seleccionada de dicha pluralidad.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha etapa de selección comprende,

30 - poner en contacto dicha pluralidad de fracciones con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor, en donde dicha sonda de ácido nucleico está unida a un marcador detectable, e identificar fracciones que comprenden dichas secuencias del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionadas, u

35 - obtener secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de fracciones e identificar la fracción que comprende dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor seleccionada.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha etapa de selección de secuencia comprende las etapas de

40 - alinear dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T;

45 - agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas en dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en donde las secuencias de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica o prácticamente idéntica;

50 - determinar el número de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T asociadas a cada clonotipo o determinar el número de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T asociadas a cada clonotipo, produciendo de este modo una frecuencia de clonotipos para cada uno de dichos clonotipos;

55 - seleccionar un clonotipo específico de tumor de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en donde dicho clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y

60 - seleccionar una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor seleccionado como dicha secuencia de ácido nucleico del receptor específico de tumor o seleccionar una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor seleccionado como dicha secuencia de aminoácidos específica de tumor.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende adicionalmente

- proporcionar una muestra no tumoral obtenida de dicho paciente;
- aislar una preparación de ácido nucleico de dicha muestra no tumoral en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
- obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha preparación de ácido nucleico o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T, produciendo una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T no específicos de tumor o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T no específicos de tumor;
- alinear dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T no específicos de tumor o dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T no específicos de tumor;
- agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T, comprendidas en dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T no específicos de tumor o dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T no específicos de tumor, en una pluralidad de clonotipos no específicos de tumor, en donde las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica o prácticamente idéntica;
- seleccionar un clonotipo específico de tumor de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en donde
 - dicho clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de la muestra tumoral o es otro clonotipo de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a un aminoácido del receptor de linfocitos T codificado por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y
 - dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral está ausente en dicha muestra no tumoral o puede asignarse a un clonotipo no específico de tumor que presenta una frecuencia de no más más del 20 %, el 15 %, el 10 % o el 5 % de la frecuencia de dicho clonotipo específico de tumor.

8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, que comprende adicionalmente:

- proporcionar una muestra de sangre obtenida de dicho paciente;
- aislar una preparación de ácido nucleico de dicha muestra de sangre en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
- obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de dicha preparación de ácido nucleico o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;
- alinear dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T;
- agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra de sangre, en donde secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica o prácticamente idéntica;
- seleccionar un clonotipo específico de tumor de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en donde
 - dicho clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de la muestra tumoral o es otro clonotipo de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a un aminoácido del receptor de linfocitos T codificado por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y
 - dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de la muestra tumoral puede asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestra una frecuencia menor que la frecuencia de dicho clonotipo específico de tumor.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende adicionalmente:

- proporcionar una muestra sin células obtenida de dicho paciente;
- aislar una preparación de ácido nucleico de dicha muestra sin células en una etapa de aislamiento de ácidos

nucleicos;

- obtener una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T a partir de dicha preparación de ácido nucleico o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificadas por dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T;
- alinear dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T;
- agrupar secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas en dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas en dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos de linfocitos T en una pluralidad de clonotipos de la muestra sin células, en las que las secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T o las secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de un clonotipo particular presentan una secuencia idéntica o prácticamente idéntica;
- seleccionar un clonotipo específico de tumor de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, en donde
 - dicho clonotipo específico de tumor es uno de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral o es otro clonotipo de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y
 - dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de la muestra tumoral puede asignarse a un clonotipo de la muestra sin células.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral puede asignarse a otro clonotipo de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos más frecuentes o a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor de los 100 clonotipos específicos de tumor más frecuentes.

15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que se selecciona el clonotipo más frecuente de dichos clonotipos de la muestra tumoral u otro clonotipo de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a un aminoácido del receptor de linfocitos T codificado por una secuencia del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor más frecuente, en donde en particular dicho clonotipo más frecuente está ausente en dicha muestra no tumoral o puede asignarse a un clonotipo no tumoral que muestra una frecuencia de no más del 20 %, el 15 %, el 10 % o el 5 % de la frecuencia de dicho clonotipo específico de tumor, y/o puede asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestra una frecuencia menor que la frecuencia de los respectivos clonotipos de dicha muestra tumoral, y/o puede asignarse a un clonotipo sin células y/o puede asignarse a otro clonotipo de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor más frecuente.

20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, que comprende

- seleccionar 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor de dicha muestra tumoral, en los que
 - dichos clonotipos específicos de tumor seleccionados son 5, 10, 15 o 20 de los 100 clonotipos más frecuentes, los 5 clonotipos más frecuentes, los 10 clonotipos más frecuentes, los 15 clonotipos más frecuentes o los 20 clonotipos más frecuentes de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral y/o son otros clonotipos de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenden una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro de uno cualquiera de dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral y, opcionalmente,
 - dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados están ausentes en dicha muestra no tumoral o pueden asignarse a un clonotipo no específico de tumor que presenta una frecuencia de no más del 20 %, el 15 %, el 10 % o el 5 % de la frecuencia de dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos

específicos de tumor seleccionados de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y/o

- dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados pueden asignarse a un clonotipo de la muestra de sangre que muestre una frecuencia menor que la frecuencia de dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral, y/o
- dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados pueden asignarse a un clonotipo de la muestra sin células, y/o
- dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados pueden asignarse a otro clonotipo de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral que comprenden una secuencia de aminoácidos de linfocitos T que es idéntica o prácticamente idéntica a un aminoácido del receptor de linfocitos T codificado por una cualquiera de dichas secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dichos 5, 10, 15 o 10 clonotipos específicos de tumor seleccionados de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que

- uno cualquiera de dicho uno de los 100 clonotipos más frecuentes, dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asignan a un clonotipo no específico de tumor, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo específico de tumor o una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra no tumoral, o si una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra no tumoral, y/o,
- uno cualquiera de dicho uno de los 100 clonotipos más frecuentes, dichos 5, 10, 15 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo de la muestra de sangre, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra de sangre, o si una secuencia de aminoácidos de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra de sangre, y/o
- uno cualquiera de dicho uno de los 100 clonotipos más frecuentes, dichos 5, 10 o 20 clonotipos específicos de tumor seleccionados de dicha pluralidad de clonotipos de la muestra tumoral se asigna a un clonotipo de la muestra sin células, si una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T codificada por una secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra sin células, o si una secuencia de aminoácidos de linfocitos T de dicha pluralidad de secuencias de aminoácidos de linfocitos T comprendidas dentro de dicho clonotipo específico de tumor es idéntica a una secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T comprendida dentro de dicho clonotipo de la muestra sin células.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T específicos de tumor codifica la región CDR3 de una cadena del receptor de linfocitos T humano o dicha secuencia de aminoácidos del receptor de linfocitos T específicos de tumor es o está comprendida dentro de la región CDR3 de una cadena del receptor de linfocitos T humano.

15. Una preparación de linfocitos T específicos de tumor para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un paciente que tiene un tumor, en donde

- dicha preparación de linfocitos T específicos de tumor se obtiene mediante las etapas de:

a. seleccionar clones de linfocitos T específicos de tumor:

- proporcionando una muestra de tumor obtenida de dicho paciente;
- aislando una preparación de ácido nucleico de dicha muestra tumoral en una etapa de aislamiento de ácido nucleico;
- obteniendo una pluralidad de secuencias de ácido nucleico del receptor de linfocitos T de dicha preparación de ácido nucleico o una pluralidad de secuencias de aminoácidos del receptor de

Fig. 1

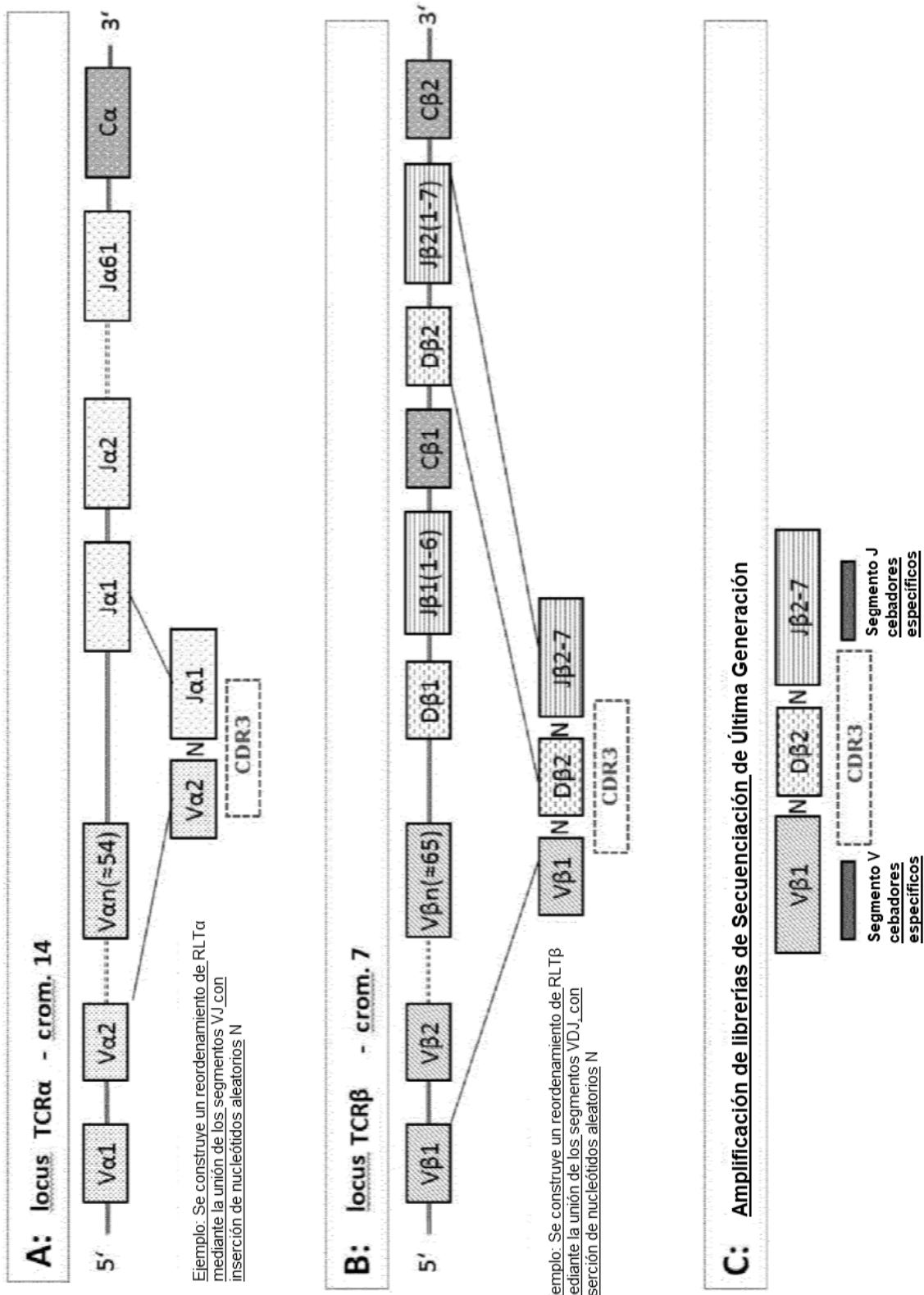


Fig. 2

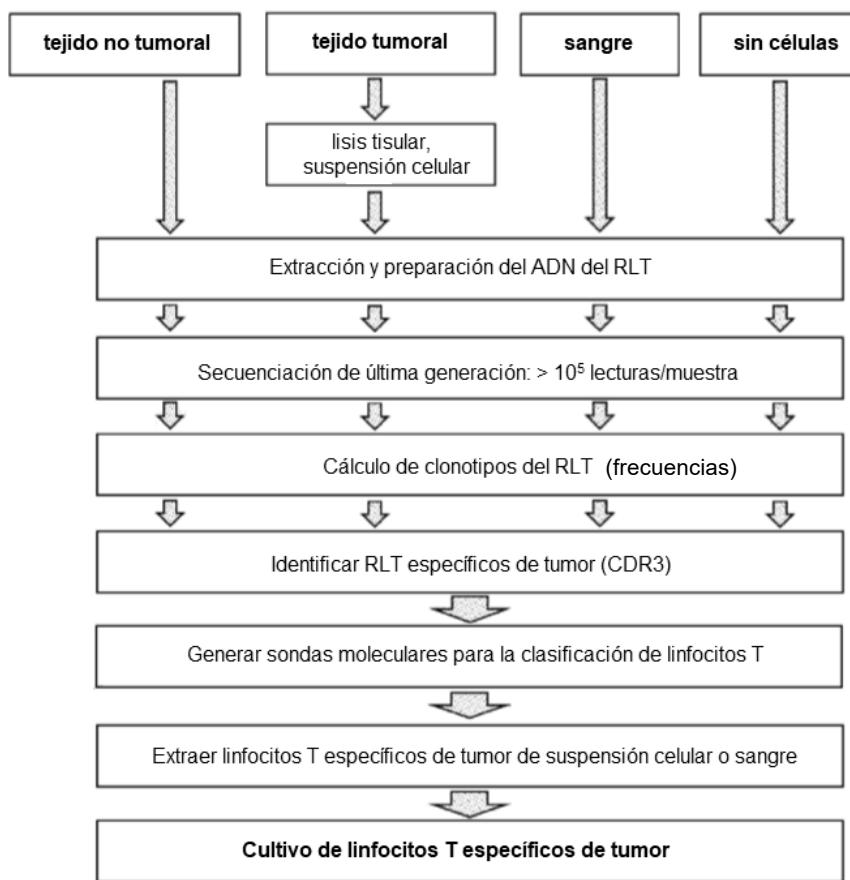


Fig. 3

