



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 598**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06727144 .5**  
96 Fecha de presentación : **19.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1885754**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

54 Título: **Receptores de linfocitos T que se unen específicamente a VYGFVRACL-HLA-A24.**

30 Prioridad: **25.05.2005 PCT/GB2005/002078**  
**30.11.2005 GB 0524477**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2011**

73 Titular/es: **IMMUNOCORE Ltd.**  
**57C Milton Park**  
**Abingdon, Oxford OX14 4RX, GB**

72 Inventor/es: **Jakobsen, Bent Karsten y**  
**Li, Yi**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 598 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Receptores de linfocitos T que se unen específicamente a VYGFVRACL-HLA-A24

La presente invención se refiere a receptores aislados de linfocitos T (TCR) que tienen la propiedad de unirse de forma específica a VYGFVRACL-HLA-A24.

5 **Antecedentes de la invención**

El péptido VYGFVRACL deriva de la subunidad catalítica de la proteína telomerasa. (Véase Meyerson y col., (1997) Cell 90: 785-795 y Nakamura y col., (1997) Science 277: 955-9) Estos estudios describen el descubrimiento casi simultáneo del ADN y la secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad catalítica de la telomerasa a partir de secuencias de bases de datos. Ambos estudios indican que la actividad de la subunidad catalítica de la telomerasa está asociada con el cáncer en seres humanos. Las moléculas del HLA de clase I de estas células cancerosas presentan péptidos de esta proteína, incluido el VYGFVRACL. Este péptido se presenta en el contexto de HLA-A24 (Arai y col., (2001) Blood 97 (9): 2903-2907, y Tajima y col., Int. J. Cancer (2004) 110: 403-412). Por tanto, el complejo VYGFVRACL-HLA-A24 proporciona un marcador de cáncer a los que se puede dirigir los TCR de la invención con el fin de, por ejemplo, liberar agentes citotóxicos en las células cancerosas.

15 **Breve descripción de la invención**

La presente invención pone a disposición por primera vez receptores aislados de linfocitos T (TCR) que tienen la propiedad de unirse de forma específica a VYGFVRACL-HLA-A24. Dichos TCR son útiles, solos o asociados con un agente terapéutico, para dirigirse a las células dianas que presentan dicho complejo.

**Descripción detallada de la invención**

20 La presente invención proporciona TCR aislados que tienen la propiedad de unirse específicamente a VYGFVRACL-HLAA24, que se caracteriza porque la región variable de la cadena alfa de los TCR tiene la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 19 y la región variable de la cadena beta del TCR tiene la SEC ID N° 3. Preferentemente, el péptido VYGFVRACL (SEC ID N° 1) se presenta en el contexto de HLA-A\*2402.

25 Los TCR que tienen la propiedad de unirse específicamente a VYGFVRACL-HLA-A24 se denomina en el presente documento TCR VYG-A24. Los TCR VYG-A24 "parentales" se definen como aquéllos que comprenden la región variable de la cadena alfa mostrada en Figura 1a (SEC ID N° 2) y la región variable de la cadena beta mostrada en la Figura 1b (SEC ID N° 3). Por ejemplo, una versión soluble unida por puentes disulfuro del TCR VYG-A24 consiste en la cadena alfa del TCR que se muestra en la figura 5A (SEC ID N° 15) y la cadena beta del TCR mostrada en la Figura 5b (SEC ID N° 16).

30 Una realización de la invención se proporciona mediante TCR no naturales que tienen la propiedad de unirse específicamente a VYGFVRACL-HLA-A24, que se caracteriza porque la región variable de la cadena alfa de los TCR tiene la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 19 y la región variable de la cadena beta del TCR tiene la SEC ID N° 3. Es decir, dichos TCR de la invención consisten en las secuencias que no se encuentran en la naturaleza.

35 Otra realización proporciona un TCR de la invención QUE SE CARACTERIZA PORQUE dicho TCR tiene  $K_D$  para dicho complejo VYGFVRACL-HLA-A\*02402 de 5  $\mu$ M o menor. El Ejemplo 4 del presente documento proporciona detalles del procedimiento basado en Biacore adecuado para determinar la  $K_D$  para la interacción entre TCR solubles y moléculas de pMHC.

40 Un aspecto adicional se proporciona mediante un TCR aislado de la invención, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) presentes en la Figura 10b (SEC ID N° 20) y/o la Figura 3b (SEC ID N° 12). Las CRD de estas cadenas de los TCR están subrayadas en las figuras correspondientes.

EL TC VYG-A24 parental específico para el complejo VYGFVRACL-HLA-A24 tiene la siguiente cadena alfa V y uso del gen de la cadena betaV:

Cadena alfa – TRAV22

Cadena beta: - TRBV 6.5

45 Los TCR VYG-A24 se pueden usar como molde a partir del cual se pueden producir otros TCR. Por tanto, la invención incluye en una realización TCR que están mutados con respecto a la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR VYG-A24 parental (véase la Figura 1a y la SEC ID N° 2) y/o la región variable de la cadena  $\beta$  (véase la Figura 1b y la SEC ID N° 3) en al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) y/o la región estructural del dominio variable de la misma. En una realización relacionada de la invención también abarca TCR que están mutados con respecto a la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR VYG-A24 (véase la Figura 10a y la SEC ID N° 19) y en al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) y/o la región estructural del dominio variable de la misma.

También se contempla que otras regiones hipervariables en los dominios variables de los TCR de la invención, tal como las regiones hipervariables 4 (HV4), pueden estar mutadas para producir un TCR mutante de alta afinidad con conserve la propiedad de unirse específicamente a VYGFVRACL-HLA-A24.

5 La expresión en fagos proporciona un medio por el cual se pueden generar bibliotecas de variantes de TCR. En (Li y col., (2005) Nature Biotech 23 (3): 349-354) y el documento WO 2004/04404 se detallan procedimientos adecuados para la expresión en fagos y la posterior detección selectiva de bibliotecas de variantes de TCR, cada una de ellos con enlaces intercatenarios disulfuros no nativos.

10 Los TCR nativos existen en formas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  heterodiméricas. No obstante, anteriormente se ha demostrado que los TCR recombinantes que consisten en una cadena sencilla  $\alpha$  de TCR o  $\beta$  de TCR se unen a moléculas peptídicas del MHC. Además, anteriormente se ha demostrado que los TCR recombinantes que consisten en una homodímeros de  $\alpha\alpha$  o  $\beta\beta$  se unen a moléculas peptídicas del MHC. Por tanto, homodímeros  $\alpha\alpha$  de TCR o  $\beta\beta$  de TCR proporcionan otras realizaciones de la invención.

En una realización, los TCR de la invención comprende tanto una región variable de la cadena  $\alpha$  como una región variable de la cadena  $\beta$  del TCR.

15 A menos que se indique lo contrario, en el presente documento se proporcionan las secuencias de aminoácidos del TCR, incluido un residuo de metionina (Met o M) en el extremo N. Como conocerán los expertos en la técnica, este residuo se puede eliminar durante la producción de proteínas recombinantes. Como también será obvio para los expertos en la técnica puede ser posible truncar las secuencias proporcionadas en el extremo C y/o el extremo N de las mismas, en 1, 2, 3, 4, 5 o más residuos, sin que afecte sustancialmente a las características de unión a pMHC del TCR, todas estas variantes triviales están abarcadas por la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "TCR aislados" quiere decir TCR en un formato distinto al que se encuentra en la naturaleza, por ejemplo un TCR soluble o un TCR presentado sobre una célula que no ha sido transfectada de forma natural con el material genético que codifica dicho TCR.

25 Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "región variable" abarca todos los aminoácidos de un TCR dado que no están incluidos dentro del dominio constante como están codificados en el gen TRAC para las cadenas  $\alpha$  de TCR y bien TRBC1 o bien TRBC2 para las cadenas  $\beta$  de TCR. (T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8)

30 Realizaciones preferidas proporcionan un TCR de la invención que comprende: la región variable de la cadena alfa mostrada en la Figura 1a (SEC ID N° 2) y la región variable de la cadena beta mostrada en la Figura 1b (SEC ID N° 3) o variantes fenotípicamente silentes de las mismas. Por ejemplo, un TCR que comprende la secuencia de de aminoácidos de SEC ID N° 15 (Figura 5a) y la SEC ID N° 16 (Figura 5b). Esta cadena alfa del TCR es la de un TCR conocido específico para el complejo ILAKFLHWL-HLA-A\*0201. La secuencia de ADN y de aminoácidos de esta cadena alfa de TCR se publicó por primera vez en el documento WO 2005/116075.

Otras realizaciones preferidas proporcionan un TCR de la invención que comprende:

35 la región variable de la cadena alfa mostrada en la Figura 10a (SEC ID N° 19) y la región variable de la cadena beta mostrada en la Figura 1b (SEC ID N° 3) o variantes fenotípicamente silentes de las mismas. Por ejemplo, un TCR que comprende la secuencia de de aminoácidos de SEC ID N° 20 (Figura 10b) y la SEC ID N° 16 (Figura 5b).

40 En una realización relacionada, dichos TCR de la invención pueden comprender además la secuencia de aminoácidos de la región constante truncada de la cadena alfa mostrada en la Figura 6a (SEC ID N° 4) y una de las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena beta truncada mostradas en las Figuras 6b y 6c (SEC ID N° 5 y 6) o variantes fenotípicamente silentes de las mismas.

45 Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "variantes fenotípicamente silentes" hace referencia a los TCR que conservan la propiedad de unión al péptido VYGFVRACL derivado de la telomerasa en el contexto del HLA-A24. Por ejemplo, como saben los expertos en la técnica, puede ser posible producir TCR que incorporen cambios minoritarios en los dominios constantes y/o las regiones variables de los mismos en comparación con los detallados anteriormente sin alterar la constante de afinidad y/o de disociación para la interacción con el complejo VYGFVRACL-HLA-A24. Dichas variantes triviales están incluidas dentro del ámbito de la presente invención. Los TCR en los que se han realizado una o más sustituciones conservadoras también forman parte de la presente invención.

50 En un amplio aspecto, los TCR de la invención están en forma de TCR de cadena sencilla (scTCR) o TCR diméricos (dTCR), incluidos, entre otros, los descritos en el documento WO 04/033685 y el documento WO 03/020763 respectivamente.

Una forma scTCR adecuada comprende un primer segmento constituido por una secuencia de aminoácidos

correspondiente a una región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR, un segundo segmento constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de región variable de la cadena  $\beta$  de TCR condensado en el extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  del TCR y una secuencia ligadora que une el extremo C del primer segmento al extremo N del segundo segmento.

5 Como alternativa, el primer segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena  $\beta$  del TCR; el segundo segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR condensada con el extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  del TCR.

10 Los scTCR anteriores pueden comprender además un puente disulfuro entre la primera y la segunda cadena, siendo dicho puente disulfuro uno que no tiene equivalente en los receptores  $\alpha\beta$  nativos de linfocitos T y en el que la longitud de la secuencia ligadora y la posición del puente disulfuro son tales que las secuencias de la región variable del primero y segundo segmento están mutuamente orientados sustancialmente como en los receptores  $\alpha\beta$  nativos de linfocitos T.

15 Más específicamente, el primer segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR condensada con el extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  del TCR, el segundo segmento puede estar constituido por una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región variable de la cadena P del TCR condensada con el extremo N de una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  del TCR y se puede proporcionar un puente disulfuro entre las cadenas primera y segunda, siendo dicho puente disulfuro uno que no tiene equivalente en los receptores  $\alpha\beta$  nativos de linfocitos T.

20 En las formas de scTCR anteriores, la secuencia ligadora puede unir el extremo C del primer segmento con el extremo N del segundo segmento y puede tener la fórmula -PGGG-(SGGGG) $n$ -P-, en la que n es 5 ó 6 y P es prolina, G es glicina y S es serina:

-PGGG-SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEC ID N° 7)

-PGGG-SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG-P (SEC ID N° 8)

30 Una forma de dTCR adecuada de los TCR de la presente invención comprende un primer polipéptido en el que una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR está condensada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  del TCR, y un segundo polipéptido en el que una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  del TCR condensada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  del TCR, estando el primero y el segundo polipéptido unidos por un puente disulfuro que no tiene equivalente en los receptores  $\alpha\beta$  nativos de linfocitos T.

35 El primer polipéptido puede comprender una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR que está condensada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  del TCR, y un segundo polipéptido en el que una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  del TCR está condensada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  del TCR, estando el primero y el segundo polipéptido unidos por un puente disulfuro entre residuos de cisteína sustituidos por Thr48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC\*01 o TRBC2\*01 o su equivalente no humano. ("TRAC" etc. nomenclatura del presente documento según T cell receptor Factsbook, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8)

40 La forma dTCR o scTCR de los TCR de la invención pueden tener secuencias de aminoácidos correspondientes a las secuencias de las regiones constante y variable  $\alpha\beta$  de TCR humano y un puente disulfuro puede unir los residuos de aminoácidos de dichas secuencias del dominio constante, dicho puente disulfuro no tiene equivalente en los TCR nativos. El puente disulfuro está entre los residuos de cisteína correspondientes a los residuos de aminoácidos cuyos átomos de carbono en  $\beta$  están separados por menos de 0,6 nm en los TCR nativos, por ejemplo entre los residuos de cisteína sustituidos por Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y la Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01 o su equivalente no humano. Otros sitios en los que pueden introducir cisteínas para formar el puente disulfuro son los residuos siguientes en el exón 1 del TRAC\*01 para la cadena  $\alpha$  del TCR y TRBC \*01 o TRBC2\*01 para la cadena  $\beta$  del TCR:

Cadena $\alpha$ del TCR	Cadena $\beta$ del TCR	Separación entre carbonos $\beta$ nativos (nm)
Thr 45	Ser 77	0,533
Tyr 10	Ser 17	0,359
Thr 45	Asp 59	0,560
Ser 15	Glu 15	0,59

Además del puente disulfuro no nativo al que se ha hecho referencia anteriormente, la forma dTCR o scTCR de los TCR de la invención pueden incluir un puente disulfuro entre los residuos correspondientes a los unidos mediante un puente disulfuro en los TCR nativos.

5 Preferentemente, los TCR de la invención no contienen una secuencia correspondiente a la secuencia transmembrana.

Preferentemente, los TCR de la invención no contienen una secuencia correspondiente a las secuencias citoplásmicas de los TCR nativos.

Una forma de dTCR o scTCR de los TCR de la presente invención puede comprender un primer polipéptido en el que una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR está condensada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  del TCR, y un segundo polipéptido en el que una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  del TCR condensada al extremo N de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  del TCR, estando el primero y el segundo polipéptido unidos por un puente disulfuro entre los residuos de cisteína sustituidos por Thr48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC22\*01 o su equivalente no humano.

Una realización actualmente preferida de la invención proporciona un TCR que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de la SEC ID N° 15 y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de la SEC ID N° 16. Otra realización actualmente preferida de la invención proporciona un TCR que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de la SEC ID N° 20 y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta de la SEC ID N° 16

También se proporciona un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican TCR de la invención. Dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos pueden proporcionarse en una forma que se ha adaptado para la expresión en una célula huésped procarionta o eucariota. Entre las células huésped adecuadas se incluyen células bacterianas, de levaduras, de mamífero o de insectos. Por ejemplo, la célula huésped puede ser un linfocito T humano o una célula madre hematopoyética humana.

Dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos adaptados está/están mutados para reflejar la preferencia de codón de la célula huésped en la que se ha introducido. Las mutaciones introducidas son mutaciones silentes que no afectan a la secuencia de aminoácidos del polipéptido o polipéptidos codificados en la misma. GeneArt (Regensburg, Alemania) ofrecen un servicio de optimización de ácidos nucleicos adecuados (GeneOptimizer™). El documento WO 2004/059556, propiedad de GeneArt, proporciona detalles adicionales del proceso de optimización.

Otras realizaciones actualmente preferidas de la invención son proporcionadas por ácidos nucleicos que consisten en una secuencia de ADN de la cadena  $\alpha$  del TCR de longitud completa y una secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  del TCR de longitud completa. Un ácido nucleico complementario de cualquiera de los anteriores, o una secuencia de ARN correspondiente, también forma parte de la presente invención. Además, como será obvio para los expertos en la técnica, dicho ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican los TCR de la invención pueden también comprender secuencias no codificadoras (intrones).

Como será obvio para los expertos en la técnica, dichas secuencias de ADN de la cadena del TCR de longitud completa codifican las secuencias siguientes:

Una secuencia líder y las secuencias extracelular, transmembrana y citoplásmica del TCR.

40 *Monómeros PEGilados del TCR*

En una realización concreta, un TCR de la invención está asociado con al menos una cadena de polialquilenglicol. Esta

asociación puede realizarse mediante una serie de modos conocidos para los expertos en la técnica. En una realización preferida, la(s) cadena(s) de polialquileno está/están unidas covalentemente al TCR. En una realización adicional, las cadenas de polietilenglicol del presente aspecto de la invención comprenden al menos dos unidades repetidas de polietileno.

#### 5 *Complejos multivalentes de TCR*

Un aspecto de la invención proporciona un complejo multivalente de TCR que comprende al menos dos TCR de la invención. En una realización de este aspecto, al menos dos moléculas de TCR están unidas a través de restos ligadores para formar complejos multivalentes. Preferentemente, los complejos son hidrosolubles, de modo que el resto ligador deberá seleccionarse en consecuencia. Además, es preferible que el resto ligador pueda unirse a posiciones definidas sobre las moléculas de TCR, de modo que se minimiza la diversidad estructural de los complejos formados. Un realización del presente aspecto se proporciona mediante un complejo de TCR de la invención, en el que la secuencia de la cadena polimérica o del ligador peptídicos se extiende entre los residuos de aminoácidos de cada TCR que no están localizados en una secuencia de la región variable del TCR.

Dado que los complejos de la invención pueden ser útiles en medicina, se deberán escoger los restos ligadores con consideración debida a su idoneidad farmacéutica, por ejemplo su inmunogenicidad.

En la técnica se conocen ejemplos de restos ligadores que cumplen los criterios deseables anteriores, por ejemplo en las técnicas de unir fragmentos de anticuerpos.

Hay dos clases de ligadores que se prefieren para usar en la producción de moléculas de TCR multivalentes de la presente invención. Estas son cadenas poliméricas no peptídicas o secuencias ligadoras peptídicas. Un complejo de TCR de la invención en el que los TCR están unidos mediante una cadena de polialquilenglicol proporciona una realización del presente aspecto.

Los primeros son polímeros hidrófilos tales como polialquilenglicoles. Los más usados de esta clase se basan en polietilenglicol o PEG, cuya estructura se muestra más adelante.



En la que n es superior a dos. No obstante, otros se basan en otros polialquilenglicoles adecuados opcionalmente sustituidos incluyen polipropilenglicol y copolímeros de etilenglicol y propilenglicol.

Dichos polímeros se pueden usar para tratar o conjugar agentes terapéuticos, particularmente terapéuticos polipeptídicos o proteínicos, para conseguir cambios beneficiosos del perfil de FC del agente terapéutico, por ejemplo menor aclaramiento renal, mejor semivida en plasma, menor inmunogenicidad y mejor solubilidad. Se cree que dichas mejoras en el perfil de FC del conjugado PEG-terapéutico son el resultado de la formación por la molécula o moléculas de PEG de una "cubierta" alrededor del agente terapéutico que impide estéricamente la reacción con el sistema inmunitario y reduce la degradación proteolítica. (Casey y col., (2000) Tumor Targeting 4: 235-344). El tamaño del polímero hidrófilo usado en particular se puede seleccionar en base al uso terapéutico previsto del complejo TCR. Por tanto, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en el tejido para, por ejemplo, usar en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar polímeros de bajo peso molecular en el orden de 5 kDa. Existen numerosos artículos de revisión y libros que detallan el uso de PEG y moléculas similares en formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, véase Harris (1992) Polyethylene Glycol Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, New York, NY., o Harris & Zalipsky (1997) Chemistry and Biological Applications of polyethylene Glycol ACS Books, Washington, D.C.

El polímero usado puede tener una conformación lineal o ramificada. Las moléculas de PEG ramificadas, o derivados de las mismas, se pueden inducir mediante la adición de restos de ramificación, incluidos glicerol y oligómeros de glicerol, pentaeritritol, sorbitol y lisina.

Normalmente, el polímero tendrá un grupo o grupos químicamente reactivos en su estructura, por ejemplo en uno o ambos extremos, y/o ramas a partir de la estructura, para permitir que el polímero se una a sitios diana en el TCR. Este grupo o grupos químicamente reactivos se pueden unir directamente al polímero hidrófilo o puede haber un grupo/resto espaciador entre el polímero hidrófilo y la química reactiva como se muestra a continuación:

Agente químico reactivo-Polímero hidrófilo-Agente químico reactivo

Agente químico reactivo-Espaciador-Polímero hidrófilo-Espaciador-Agente químico reactivo

El espaciador usado en la formación de construcciones del tipo que se indica anteriormente puede ser cualquier resto orgánico que sea una cadena no reactiva químicamente estable. Dichos espaciadores incluyen, entre otros, los siguientes:

$-(CH_2)_n-$  en el que  $n =$  de 2 a 5

$-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2$

5 Un complejo de TCR de la invención en el que un radical espaciador de alquileo divalente se localiza entre la cadena de polialquilenglicol y su punto de unión a un CTR del complejo proporciona una realización adicional del presente aspecto.

Un complejo de TCR de la invención en el que la cadena de polialquilenglicol comprende al menos dos unidades repetitivas de polietilenglicol proporciona una realización adicional del presente aspecto.

10 Existe una serie de proveedores comerciales de polímeros hidrófilos unidos, directamente o a través de un espaciador, a químicas reactivas, que pueden ser de utilidad en la presente invención. Estos proveedores incluyen Nektar Therapeutics (CA, EE.UU.), NOF Corporation (Japón), Sunbio (Corea del Sur) y Enzon Pharmaceuticals (NJ, EE.UU.).

Polímeros hidrófilos disponibles comercialmente unidos, directamente o a través de un espaciador, a químicas reactivas que pueden ser de utilidad en la presente invención incluyen, entre otros, los siguientes:

Descripción del ligador PEG	Fuente de PEG	Número de catálogo
<b>Unión al monómero de TCR</b>		
5 K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2MOHO1
20 K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2MOPO1
20 K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-200MA
20 K ramificado (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT GL-2-200MA
30 K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-300MA
20 K ramificado (Maleimida)	Nektar	2D3XOTO1
5 K-NP lineal (para unión a Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-50H
10 K-NP lineal (para unión a Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-10T
20 K-NP lineal (para unión a Lys)	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-20T
<b>Ligadores del dímero de TCR</b>		
3,4 K lineal (Maleimida)	Nektar	2D2DOFO2
5 K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOHOF
10 K lineal (con ds-ligadores de ortopiridilo en lugar de Maleimida)	Sunbio	
20 K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D2DOPOF
20 K lineal (Maleimida)	NOF Corporation	
40 K bifurcado (Maleimida)	Nektar	2D3XOTOF
<b>Multímeros de TCR de orden superior</b>		
15 K, 3 ramas, Mal <sub>3</sub> (para el trímero)	Nektar	OJOONO3
20 K, 4 ramas, Mal <sub>3</sub> (para el tetrámero)	Nektar	OJOOP04
20 K, 4 ramas, Mal <sub>8</sub> (para el octámero)	Nektar	OJOOTO8

Se puede usar una amplia variedad de químicas de acoplamiento para acoplar moléculas poliméricas a terapéuticos proteínicos y peptídicos. La elección de la química de acoplamiento más adecuada depende en gran medida del sitio de acoplamiento deseado. Por ejemplo, se han usado las siguientes químicas de acoplamiento unidas a uno o más de los extremos de las moléculas de PEG (Fuente: Catálogo de Nektar Molecular Engineering de 2003):

- 5 N-maleimida
- Sulfona de vinilo
- Carbonato de benzotriazol
- Propionato de succinimidilo
- Butanoato de succinimidilo
- 10 Tioéster
- Acetaldehídos
- Acrilatos
- Biotina
- Aminas primarias

- 15 Como se ha indicado con anterioridad, los polímeros no basados en PEG también proporcionan ligadores adecuados para multimerizar los TCR de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar restos que contienen extremos de maleimida unidos por cadenas alifáticas tales como BMH y BMOE (Pierce, productos de nº 22330 y 22323).

- Los ligadores peptídicos son la otra clase de ligadores de TCR. Estos ligadores están compuestos por cadenas de aminoácidos y funcionan produciendo ligadores sencillos o dominios de multimerización sobre los que se pueden unir moléculas de TCR. El sistema biotina/estreptavidina se ha usado previamente para producir tetrámeros de TCR (véase el documento WO/99/60119) para estudios de unión in vitro. Sin embargo, la estreptavidina es un polipéptido derivado de microbios y, como tal, no está adaptado idealmente para usar en un agente terapéutico.
- 20

Un complejo de TCR de la invención en el que los TCR están unidos mediante un ligador peptídico derivado de un dominio de multimerización humano proporciona una realización adicional del presente aspecto.

- 25 Existe una serie de proteínas humanas que contienen un dominio de multimerización que podrían usarse en la producción de complejos de TCR multivalentes. Por ejemplo, el dominio de tetramerización de p53 que se ha usado para producir tetrámeros de fragmentos de anticuerpos scFv que exhibían un incremento de la persistencia sérica y reducía significativamente la tasa de disociación en comparación con el fragmento scFV monomérico. (Willuda y col. (2001) J. Biol. Chem. 276 (17): 14385-14392) La hemoglobina también tiene un dominio de tetramerización que
- 30 potencialmente podría usarse para este tipo de aplicación.

Un complejo de TCR multivalente de la invención que comprende al menos dos TCR proporciona una última realización de este aspecto en la que al menos uno de dichos TCR está asociado con un agente terapéutico.

En un aspecto, un TCR (o complejo multivalente del mismo) de la presente invención puede comprender, de forma alternativa o adicional) una cisteína reactiva en el extremo C o el extremo N de las cadenas alfa o beta del mismo.

- 35 *Diagnóstico y uso terapéutico*

En un aspecto, el TCR de la invención se puede asociar con un agente terapéutico o resto detectable. Por ejemplo, dicho agente terapéutico o resto detectable puede estar unido covalentemente al TCR.

En una realización de la invención, dicho agente terapéutico o resto detectable está unido covalentemente al extremo C de una o ambas cadenas del TCR.

- 40 En un aspecto, el scTCR o una o las dos cadenas del dTCR de los TCR de la presente invención pueden marcarse con un resto detectable, por ejemplo un marcador que sea adecuado para propósitos diagnósticos. Tales TCR marcados son útiles en un procedimiento para detectar un complejo VYGFVRACL-HLA-A\*0201, en el que el procedimiento comprende poner en contacto el ligando del TCR con un TCR (o un complejo de TCR de alta afinidad multimérico) que sea específico del ligando del TCR; y detectar la unión al ligando del TCR. En los complejos de TCR tetraméricos formados, por ejemplo, usando heterodímeros biotinilados, se puede usar estreptavidina fluorescente para proporcionar un marcador detectable. Dicho tetrámero de TCR marcado con fluorescencia es adecuado para usar en el análisis FACS para, por ejemplo, detectar células presentadoras de antígeno portadoras del complejo VYGFVRACL-HLA-A\*0201 para el que son específicos estos TCR.
- 45

Otro modo por el que se pueden detectar los TCR solubles permitidos de la presente invención es mediante el uso de anticuerpos específicos de linfocitos T (p. ej., anticuerpos anti-CD3), en particular anticuerpos monoclonales. Hay muchos anticuerpos anti-linfocitos T comercialmente disponibles, tales como  $\alpha$ F1 y  $\beta$ F1, que reconocen los dominios constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR respectivamente.

5 En otro aspecto, un TCR (o complejo multivalente del mismo) de la presente invención puede asociarse (p. ej., de forma covalente o mediante otro tipo de enlace), como alternativa o adicionalmente, con un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, un resto citotóxico para usar para matar células, o una molécula efectora inmunitaria tal como una interleucina o una citocina. Un complejo de TCR multivalente de la invención puede poseer una capacidad de unión potenciada por un ligando de TCR en comparación con un receptor de linfocitos T heterodimérico o silvestre. Por  
10 tanto, los complejos de TCR multivalentes de acuerdo con la invención son particularmente útiles para el seguimiento u orientación de células presentadoras de antígenos concretos in vitro o in vivo y también son útiles como intermediarios para la producción de otros complejos multivalentes de TCR que tienen tales usos. Estos TCR o complejos multivalentes de TCR pueden, por tanto, proporcionarse en una formulación farmacéuticamente aceptable para usar in vivo.

15 La invención también proporciona un procedimiento para administrar un agente terapéutico a una célula diana, en el que el procedimiento comprende poner en contacto posibles células diana con un TCR o un complejo multivalente de TCR de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la unión del TCR o del complejo multivalente de TCR con la célula diana, siendo dicho TCR o complejo multivalente de TCR específico del complejo VYGFVRACL-HLA-A24 y teniendo el agente terapéutico asociado.

20 En particular, el TCR soluble o el complejo multivalente de TCR de la presente invención se pueden usar para administrar agentes terapéuticos en la localización de células que presentan un antígeno concreto. Esto sería útil en muchas situaciones y, en particular, frente a tumores. Se podría liberar un agente terapéutico de modo que ejerciera su efecto localmente, pero no sólo sobre la célula a la que se une. Por tanto, una estrategia concreta prevé moléculas anti-tumorales unidas a TCR o a complejos multivalentes de TCR de acuerdo con la invención específicos para antígenos  
25 tumorales.

Muchos agentes terapéuticos podrían emplearse para este uso, por ejemplo compuestos radiactivos, enzimas (perforina, por ejemplo) o agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino). Para garantizar que los efectos tóxicos se ejercen en la localización deseada, la toxina podría estar dentro de un liposoma unido a estreptavidina de modo que el compuesto se libere lentamente. Esto evitará que se produzcan efectos dañinos durante el transporte en el cuerpo y  
30 asegurará que la toxina tenga el efecto máximo después de la unión del TCR a las células presentadoras de antígeno relevantes.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad de matar células de mamífero que tienen un peso molecular inferior a 700 daltons. Tales compuestos podrían también contener metales  
35 tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, debe entenderse que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen pro-fármacos, es decir, compuestos que se degradan o convierten en condiciones fisiológicas para liberar los agentes citotóxicos. Ejemplos de dichos agentes incluyen cisplatino, derivados de maytansina, raquelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, sorfimer sodiofotofrina II, temozolmida, topotecán, trimetreato glucuronato, auristatin E vincristina y doxorubicina;
- citotoxinas peptídicas, es decir proteínas o fragmentos de las mismas con la capacidad de matar células de mamífero. Incluidas, entre otras, ricino, toxina diftérica, exotoxina A de la bacteria pseudomonas, y variantes de los mismos tales como PE38, ADNasa y ARNasa;
- radionúclidos, es decir isótopos inestables de elementos que se descomponen con la emisión concurrente de una o más partículas  $\alpha$  o  $\beta$ , o rayos  $\gamma$ , incluidos, entre otros, yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astatina 213; se pueden usar agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionúclidos con los TCR o multímeros de los mismos;
- profármacos, incluidos, entre otros, profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos;
- Inmunoestimulantes, es decir restos que estimulan la respuesta inmunitaria. Incluidos, entre otros, citocinas tales como IL-2 e IFN, superantígenos y mutantes de los mismos, complejos de pHLA y quimiocinas tales como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimuladora del crecimiento de melanoma, etc., anticuerpos o fragmentos de los mismos, activadores del complemento, dominios de proteína xenogénea, dominios de proteína alogénea, dominios de proteína viral/bacteriana, péptidos virales/bacterianos y anticuerpos determinantes anti-linfocitos T  
50 (p. ej., anti-CD3 o anti-CD28).

*Fragmentos de anticuerpos funcionales y variantes*

Fragmentos de anticuerpos y variantes/análogos que son adecuados para usar en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, los siguientes.

*Fragmentos de anticuerpos*

- 5 Como conocen los expertos en la técnica, es posible producir fragmentos de un anticuerpo dado que conserven sustancialmente las mismas características de unión que los del anticuerpo parental. A continuación se proporcionan detalles de dichos fragmentos:

Minicuerpos- Estas construcciones consisten en anticuerpos con una porción Fc troncada. Como tal, conservan los dominios de unión completos del anticuerpo del que derivan.

- 10 Fragmentos Fab- Estos comprenden una cadena sencilla ligera de inmunoglobulina unida covalentemente a parte de una cadena pesada de inmunoglobulina. Como tales, los fragmentos Fab comprenden un sitio sencillo de combinación antigénica. Los fragmentos Fab están definidos por la porción de una IgG que se puede liberar mediante tratamiento con papaína. Dichos fragmentos se producen habitualmente mediante técnicas de ADN recombinante. (Reeves y col., (2000) Lecture Notes on Immunology (4ª Edición) Publicado por Blackwell Science)

- 15 Fragmentos F(ab')<sub>2</sub>- Estos comprenden tanto los sitios de combinación antigénica como la región bisagra de un anticuerpo sencillo. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> están definidos por la porción de una IgG que se puede liberar mediante tratamiento con pepsina. Dichos fragmentos se producen habitualmente mediante técnicas de ADN recombinante. (Reeves y col., (2000) Lecture Notes on Immunology (4ª Edición) Publicado por Blackwell Science)

- 20 Fragmentos Fv- Estos comprenden un dominio pesado variable de inmunoglobulina unido a un dominio ligero variable de inmunoglobulina. Se ha producido una serie de diseños Fv. Estos incluyen scFv en los que la asociación entre los dos dominios está potenciada mediante un puente disulfuro introducido. Como alternativa, los scFv se pueden formar usando un ligador peptídico para unir los dos dominios en forma de un polipéptido sencillo. También se han producido construcciones de Fv que contienen una región variable de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina asociada con el dominio variable y constante de la correspondiente cadena pesada o ligera de inmunoglobulina. Los Fv también se han multimerizado para formar diacuerpos y triacuerpos (Maynard y col., (2000) Annu Rev Biomed Eng 2 339-376).

- 25 Nanobodies™ - Estas construcciones, comercializadas por Ablynx (Bélgica), comprenden un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina sencillo sintético derivado de un anticuerpo de camélido (p. ej., de camello o de llama).

- 30 Anticuerpos de dominio- Estas construcciones, comercializadas por Domantis (Bélgica), comprenden un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina sencillo maduro o un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina.

35 *Variantes y análogos de anticuerpos*

- La característica funcional definitoria de los anticuerpos en el contexto de la presente invención es su capacidad para unirse específicamente a un ligando diana. Como conocen los expertos en la técnica, es posible realizar ingeniería de dichas características de unión en una serie de otras proteínas. Ejemplos de variantes y análogos de anticuerpos que son adecuados para usar en las composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen, entre otros, los siguientes.

- 40 Polipéptidos de unión basados en armazón proteico- Esta familia de construcciones de unión comprenden análogos mutados de proteínas que contienen bucles de unión nativos. Ejemplos incluyen Affibodies, comercializados por Affibody (Suecia), que están basados en un motivo de triple hélice derivado de uno de los dominios de unión de IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Otro ejemplo se proporciona mediante Evibodies, comercializados por EvoGenix (Australia), que están basados en los dominios extracelulares de CTLA-4i en los que se injertan los dominios similares a los bucles de unión del anticuerpo. Un último ejemplo, Cytokine Traps comercializados por Regeneron Pharmaceuticals (US), injerta dominios del receptor de citocinas en los armazones de los anticuerpos. (Nygren y col., (2000) Current Opinion in Structural biology 7:463-469) proporciona una revisión de los usos de armazones para ingeniería de nuevos sitios de unión en proteínas. Esta revisión menciona las siguientes proteínas como fuentes de armazones: dedo de cinc CP1, Tendamistat, dominio Z (un análogo de la proteína A), PST1, hélices superenrolladas, LACI-D1 y el citocromo b562. Otros estudios con armazones proteicos han notificado el uso de repeticiones de fibronectina, proteína fluorescente verde (GFP) y anquirina.

Como conocen los expertos en la técnica, se pueden producir anticuerpos o fragmentos, variantes o análogos de los

mismos que se unen a varias partes de un ligando proteico dado. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos anti-CD3 para cualquiera de las cadenas polipeptídicas a partir de las cuales se forma este complejo (es decir, las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\eta$  de CD3). Los anticuerpos que se unen a la cadena  $\epsilon$  de CD3 son los anticuerpos anti-CD3 preferidos para usar en las composiciones y procedimientos de la presente invención.

- 5 Los TCR solubles o complejos multivalentes de TCR de la invención pueden unirse a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco. Esto permite que el profármaco se convierta en el fármaco únicamente en el sitio en el que es necesario (es decir, dirigido por el sTCR). Cabe esperar que los TCR específicos de VYGFVRACL (SEC ID N° 1)-HLA-A24 divulgados en el presente documento se puedan usar en procedimientos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.
- 10 Para el tratamiento del cáncer, la localización en las proximidades de tumores o metástasis potenciaría el efecto de toxinas o inmunostimulantes. Para la administración de vacunas, el antígeno vacunal podría localizarse en las proximidades de las células presentadoras de antígeno, lo que potencia la eficacia del antígeno. El procedimiento también se puede aplicar con fines de imagen.

- 15 Una realización se proporciona mediante una célula presentadora de un TCR de la invención. Otra realización relacionada se proporciona mediante una célula transfeccionada para que presente un TCR de la invención. La célula presentadora o transfeccionada para presentar los TCR de la invención puede ser, preferentemente, un linfocito T humano o una célula madre hematopoyética humana. Las células presentadoras de los TCR de la invención son útiles en el tratamiento del cáncer mediante procedimientos de terapia adoptiva. Estos procedimientos proporcionan un medio de dirigir células, tales como linfocitos T, a una población de células diana en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un paciente de cáncer una pluralidad de células presentadoras de los TCR de la invención que son específicas del ligando VYGFVRACL-HLA-A24 sobre la población de las células diana.
- 20

Otras realizaciones de la invención se proporcionan mediante una composición farmacéutica que comprende:

- 25 un TCR o complejo multivalente de TCR de la invención (opcionalmente asociado con un agente terapéutico) o una pluralidad de células presentadoras de al menos un TCR de la invención o un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un TCR de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable;

- La invención también proporciona un procedimiento de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un sujeto que sufra dicha enfermedad cancerosa una cantidad eficaz de un TCR o complejo multivalente de TCR de la invención (opcionalmente asociado con un agente terapéutico) o una pluralidad de células presentadoras de al menos un TCR de la invención o un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un TCR de la invención. En una realización relacionada, la invención proporciona el uso de un TCR o complejo multivalente de TCR de la invención (opcionalmente asociado con un agente terapéutico) o una pluralidad de células presentadoras de al menos un TCR de la invención o un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un TCR de la invención en la preparación de una composición para el tratamiento del cáncer.
- 30

- 35 Normalmente, los TCR terapéuticos o para imagen de acuerdo con la invención se suministrarán como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (Dependiendo del procedimiento deseado de administración a un paciente). Puede proporcionarse en forma de dosificación unitaria, generalmente se proporcionarán en un envase sellado y puede proporcionarse como parte de un kit. Normalmente (aunque no necesariamente), tal kit incluiría instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosificación unitaria.
- 40

- La composición farmacéutica puede adaptarse para su administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo por vía parenteral, transdérmica o inhalación, preferentemente por vía parenteral (incluidas las vías subcutánea, intramuscular o, más preferentemente, intravenosa). Dichas composiciones pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo mezclando el ingrediente activo con el(los) portador(es) o excipiente(s) en condiciones estériles.
- 45

Las dosis de los sustratos de la presente invención pueden variar entre amplios límites, en función de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y el estado del individuo que se va a tratar etc., y, en última instancia, será un médico el que determine las dosis adecuadas que se habrán de usar.

#### *Aspectos adicionales*

- 50 Un scTCR o dTCR (que preferentemente está constituido por secuencias constantes y variables correspondientes a secuencias humanas) de la presente invención se puede proporcionar en forma sustancialmente pura o en forma de preparación purificada o aislada. Por ejemplo, se puede proporcionar en una forma que esté sustancialmente libre de otras proteínas.

Los TCR de alta afinidad que tienen la propiedad de unirse específicamente a VYGFVRACL-HLA-A\*2402, y (i) que comprenden al menos una región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR y/o al menos una región variable de la cadena  $\beta$  del TCR y (ii) que tiene una  $K_D$  para dicho complejo VYGFVRACL- HLA-A\*2402 inferior o igual a 1  $\mu$ M se pueden identificar mediante un procedimiento que comprende:

- 5 (a) la producción de una pluralidad de TCR, comprendiendo cada uno las regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR de VYG-A24 parental en el que una o las dos regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  comprenden una o más mutaciones;
- (b) poner en contacto dichos TCR mutados con VYGFVRACL- HLA-A\*2402 en condiciones adecuadas que permitan la unión del TCR a VYGFVRACL-HLA-A\*2402; y
- 10 (c) medir la  $K_D$  de la interacción y seleccionar un TCR que tenga la  $K_D$  deseada.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los demás aspectos *mutatis mutandis*. Los documentos de la técnica anterior mencionados en el presente documento se incorporan en la máxima extensión permitida por la legislación.

### **Ejemplos**

- 15 La invención se describe adicionalmente en los ejemplos siguientes, que no limitan el ámbito de la invención de ningún modo.

A continuación se hace referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Las Figuras 1a y 1b proporcionan las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena alfa y de aminoácidos de la región variable de la cadena beta del TCR VYG -A24 parental, respectivamente.

- 20 Las Figuras 2a y 2b proporcionan, respectivamente, la secuencia de ADN de las versiones solubles de las cadenas  $\alpha$  and  $\beta$  del TCR de VYG -A24 parental. Los sitios de reconocimiento por las enzimas de restricción *Nde1* y *HindIII* están subrayados.

- 25 Las Figuras 3a y 3b proporcionan, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de las versiones solubles de las secuencias de aminoácidos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR VYG -A24 parental producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 2a y 2b. Las secuencias de las CDR en estas cadenas de TCR soluble están subrayadas.

- 30 Las Figuras 4a y 4b proporcionan, respectivamente, la secuencia de ADN de las versiones solubles de las cadenas  $\alpha$  and  $\beta$  del TCR de VYG -A24 parental mutadas de modo que incluyan residuos adicionales de cisteína para formar un puente disulfuro no nativo. El codón para cisteína introducido en cada cadena está indicado mediante sombreado. Los sitios de reconocimiento por las enzimas de restricción *Nde1* y *HindIII* están subrayados.

- 35 Las Figuras 5a y 5b muestran, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de las versiones solubles de las secuencias de aminoácidos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR VYG -A24 parental producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 4a y 4b. La cisteína introducida en cada cadena está indicada mediante sombreado.

La Figura 6a proporciona la secuencia de aminoácidos de una forma truncada de TRAC.

La Figura 6b proporciona la secuencia de aminoácidos de una forma truncada de TRBC1.

La Figura 6c proporciona la secuencia de aminoácidos de una forma truncada de TRBC2.

La Figura 7a proporciona el mapa plasmídico del plásmido pGMT7.

- 40 La Figura 7b proporciona la secuencia de ADN del plásmido pGMT7.

La Figura 8 detalla las secuencias de aminoácidos de la cadena beta de la versión soluble unida mediante puente disulfuro del TCR VYG-A24 parental usando la región constante codificada en TRBC2 condensada a través de un ligador peptídico a la IL-2 humana silvestre. Las secuencias del ligador y de la IL-2 están en cursiva.

- 45 La Figura 9 proporciona la curva de respuesta Biacore generada para la interacción de una versión soluble unida por un puente disulfuro del TCR VYG -A24 parental y HLA-VYGFVRACL-HLA-A\*2402.

La Figura 10a proporciona la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena alfa del TCR c8) VYG - A24.

La Figura 10b proporciona la secuencia de aminoácidos de una cadena alfa del TCR (c8) VYG -A24 e una forma soluble que incorpora un aminoácido de cisteína no nativo. El aminoácido cisteína introducido está resaltado y los aminoácidos dentro de las CDR de esta cadena de TCR están subrayados.

**Ejemplo 1- Producción de un TCR soluble unido por disulfuro que comprende las regiones variables de VYG-A24 parental**

Las Figuras 4a y 4b proporcionan las secuencias de ADN de las cadenas alfa y beta de una forma soluble unida por disulfuro del TCR VYG -A24 parental que es específico del complejo VYGFVRACL-HLA-A\*2402 . La secuencia de la cadena beta se identificó a partir de una biblioteca de fagos mediante el procedimiento al que se hace referencia en el Ejemplo 6 a continuación. La cadena alfa es la de un TCR conocido específico para el complejo ILAKFLHWL-HLA-A\*0201. La secuencia del ADN y de aminoácidos de esta cadena alfa se publicó por primera vez en el documento WO 2005/116075. Estas secuencias de ADN se pueden sintetizar *de novo* a través de una serie de empresas de investigación por contrato, por ejemplo GeneArt (Regensburg, Alemania). Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción también se añaden a estas secuencias de ADN con el fin de facilitar la unión de estas secuencias de ADN en plásmidos de expresión basados en pGMT7, que contienen el promotor de T7 para un nivel de expresión alto en la cepa de *E. coli* BL21-DE3(pLysS) (Pan y col., *Biotechniques* (2000) 29 (6): 1234-8)

Las secuencias de ADN que codifican cada cadena de TCR cortada con *NdeI* y *HindIII* se unen en distintos vectores de pGMT7, que también se cortan con *NdeI* y *HindIII*. (Véase en la Figura 7a el mapa plasmídico de pGMT7 y en la Figura 7b la secuencia de ADN de este vector (SEC ID N° 17)

Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción introducidos en el ADN que codifica las cadenas de TCR soluble de VYG-A24 parental:

*NdeI* - CATATG

*HindIII* - AAGCTT

*Unión*

Los plásmidos ligados se transforman en la cepa competente de células *E. coli* XL1-blue y se siembran en placas con LB/agar que contienen 100 mg/ml de ampicilina. Tras incubación durante la noche a 37°C se escogen colonias sencillas y se cultivan en 10 ml de LB que contiene 100 mg/ml de ampicilina durante la noche a 37°C con agitación. Los plásmidos clonados se purifican usando un kit Miniprep (Qiagen) y el inserto se secuencian usando un secuenciador de ADN automático (Lark Technologies).

Las Figuras 5a y 5b muestran, respectivamente, las secuencias de aminoácidos extracelulares de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR de VYG -A24 parental producidas a partir de las secuencias de ADN de las Figuras 4a y 4b.

**Ejemplo 2- Producción de variantes de alta afinidad de los TCR solubles de VYG-A24 unidos mediante puentes disulfuro**

El TCR soluble de VYG-A24 parental unido por disulfuro producido como se ha descrito en el ejemplo 1 se puede usar como molde a partir del cual producir los TCR de la invención que tienen una mayor afinidad por el complejo VYGFVRACL (SEC ID N° 43) -HLA-A\*0201.

Como conocen los expertos en la técnica, los cambios necesarios de codones requeridos para producir estas cadenas mutadas se pueden introducir en el ADN que codifica estas cadenas mediante mutagénesis dirigida por sitio, (QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit de Stratagene)

Brevemente, esto se puede conseguir usando cebadores que incorporan el o los cambios de codón deseados y los plásmidos pGMT7 que contienen el ADN relevante de la cadena del TCR de VYG-A24 parental como molde para la mutagénesis:

La mutagénesis se puede realizar usando las condiciones siguientes: 50 ng de molde plasmídico, 1  $\mu$ l de dNTP 10 mM, 5  $\mu$ l de 10 X tampón Pfu ADN polimerasa suministrado por el fabricante, 25 pmol del cebador directo, 25 pmol del cebador inverso, 1  $\mu$ l de pfu ADN polimerasa en un volumen total de 50  $\mu$ l. Tras una etapa de desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, la reacción se puede someter a 25 ciclos de desnaturalización (95°C, 10 s), renaturalización (55°C, 10 s) y elongación (73°C, 8 min). El producto resultante se puede digerir con la enzima de restricción DpnI para eliminar el plásmido molde y transformar en la cepa de *E. coli* XL1-blue. La mutagénesis se puede verificar mediante secuenciación.

**Ejemplo 3- Expresión, replegamiento y purificación de TCR soluble**

Los plásmidos de expresión pGMT7 que contienen las cadenas  $\alpha$  del TCR de VYG-A24 parental y las cadenas  $\beta$  de

VYG-A24 parental tal como se han preparado en el Ejemplo 1 se transformaron por separado en la cepa BL21pLys de *E. coli* y se cultivaron las colonias sencillas resistentes a ampicilina a 37°C en medio TYP (ampicilina 100 µg/ml) hasta una DO<sub>600</sub> de 0,4 antes de inducir la expresión proteica con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron tres horas después de la inducción mediante centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm en un Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un tampón que contiene Tris-HCl 50 mM, 25% de sacarosa (p/v), NaEDTA 1 mM, 0,1% de azida sódica (p/v), DTT 10 mM, pH 8,0. Después de una etapa de congelación-descongelación durante la noche, las células resuspendidas se sometieron a ultrasonidos en descargas de 1 minuto durante un total de aproximadamente 10 minutos en un ultrasonidos Milsonix XL2020 usando una sonda estándar de 12 mm de diámetro. Los sedimentos con cuerpos de inclusión se recuperaron mediante centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después se realizaron tres lavados con detergente para eliminar los residuos celulares y los componentes de membrana. Cada vez, el sedimento con los cuerpos de inclusión se homogeneizó en un tampón Triton (Tris-HCl 50 mM, 0,5% de Triton-X100, NaCl 200 mM, EDTA sódico 10 mM, 0,1% (p/v) de azida sódica, DTT 2 mM, pH 8,0) antes de sedimentar mediante centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm en un Beckman J2-21. Después, el detergente y la sal se eliminó mediante un lavado similar en el tampón siguiente; Tris-HCl 50 mM, EDTA sódico 10 mM, 0,1% (p/v) de azida sódica, DTT 2 mM, pH 8,0. Por último, los cuerpos de inclusión se dividen en alícuotas de 30 mg y se congelan a -70°C. El rendimiento proteico de los cuerpos de inclusión se cuantificó mediante solubilización con guanidina-HCl 6M y medición con un ensayo de tinción-unión de Bradford (PerBio).

Aproximadamente 30 mg de la cadena β del TCR y 60 mg de la cadena α del TCR de los cuerpos de inclusión solubilizados se descongelaron a partir de almacenamientos congelados, después, las muestras se mezclaron y la mezcla se diluyó en 15 ml de una solución de guanidina (guanidina-clorhidrato 6M, acetato sódico 10 mM, EDTA 10 mM) para garantizar la completa desnaturalización de la cadena. La solución de guanidina que contiene las cadenas de TCR completamente reducidas y desnaturalizadas se inyectó después en 1 litro del siguiente tampón de replegamiento: Tris 100 mM, pH 8,5, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, urea 5M, PMSF 0,2 mM. El acoplamiento redox (2-mercaptoetilamina y cistamina (hasta concentraciones finales de 6,6 mM, 3,7 mM, respectivamente) se añadió aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de TCR desnaturalizadas. La solución se dejó durante 5 horas ± 15 minutos. El TCR plegado de nuevo se dializó en una membrana Spectrapor 1 (Spectrum; nº de producto 132670) contra 10 l de Tris 10 mM, a pH 8,1 a 5°C ± 3°C durante 18-20 horas. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió a Tris 10 mM fresco a pH 8,1 (10 l) y la diálisis continuó a 5°C ± 3°C durante 20-22 horas.

El sTCR se separó de los productos de degradación y las impurezas cargando el replegado dializado en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM sobre 50 volúmenes de columna usando un purificador Akta (Pharmacia). Las fracciones pico se almacenaron a 4°C y se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie antes de combinar y concentrar. Por último, el sTCR se purificó y caracterizó usando una columna de filtración en gel Superdex 200HR pre-equilibrado en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,5 mM, 0,05% de nonidet p40). El pico de elución a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se combinó y se concentró antes de la caracterización mediante análisis de resonancia en plasmón superficial BIACore.

#### **Ejemplo 4 – Caracterización mediante resonancia de plasmón superficial Biacore de la unión de sTCR a pMHC específico**

Se usó un biosensor de resonancia de plasmón superficial (Biacore 3000™) para analizar la unión del TCR de VYGA24 parental a VYGFVRACL-HLA-A\*2402. Esto se facilitó produciendo complejos VYGFVRACL-HLA-A\*2402 sencillos (que se describen más adelante) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de un modo semiorientado, lo que permite un análisis eficiente de la unión de un receptor soluble de linfocitos T con hasta cuatro pMHC diferentes (inmovilizados en diferentes celdas de flujo) de forma simultánea. La inyección manual del complejo HLA permite el nivel preciso de moléculas de clase I inmovilizadas para su fácil manipulación.

Las moléculas HLA-A\*2402 biotiniladas de clase I se volvieron a pegar *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión expresados en bacterias, que contienen las subunidades proteicas constituyentes y el péptido sintético, seguido por purificación y biotinilación *in vitro* (O'Callaghan y col. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). La cadena pesada-HLA-A\*2402 se expresó con un indicador de biotinilación en el extremo C, que sustituye a los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína en un constructo adecuado. Se obtuvieron niveles de expresión del cuerpo de inclusión de ~ 75 mg/litro de cultivo bacteriano. La cadena ligera del MHC o β2-microglobulina también se expresó en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli* a partir de un constructo adecuado, a un nivel de ~ 500 mg/litro de cultivo bacteriano.

Las células de *E. coli* se lisaron y los cuerpos de inclusión se purifican hasta una pureza de aproximadamente un 80%. La proteína de los cuerpos de inclusión se desnaturalizó en guanidina-HCl 6M, Tris 50 mM a pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, y se volvió a pegar a una concentración de 30 mg/litro de la cadena pesada, 30 mg/litro de β2m en L-Arginina-HCl 0,4M, Tris 100 mM a pH 8,1, cistamina 3,7 mM, β-cisteamina 6,6 mM, 4 mg/ml del péptido VYGFVRACL requerido para cargar mediante la molécula HLA-A\*0201 mediante la adición de un único pulso de proteína desnaturalizada en tampón de replegamiento a <5°C. Se dejó que el replegamiento alcanzara el final a 4°C

durante al menos 1 hora.

El tampón se intercambi6 mediante di6lisis en 10 vol6menes de Tris 10 mM a pH 8,1. Fueron necesarios dos cambios de tamp6n para reducir suficientemente la fuerza i6nica de la soluci6n. A continuaci6n se filtr6 la soluci6n proteica a trav6s de un filtro de acetato de celulosa de 1,5  $\mu\text{m}$  y se carg6 en una columna de intercambio an6nico POROS 50HQ (8 ml de volumen de lecho). La prote6na se eluy6 con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM. El complejo HLA-A\*0201-p6ptido eluy6 a aproximadamente NaCl 250 mM y se recogieron las fracciones de los picos, se a6adi6 un c6ctel de inhibidores de la proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron en hielo.

Se cambi6 el tamp6n de las mol6culas de pMHC marcadas con biotinilaci6n a Tris 10 mM a pH de 8,1, NaCl 5 mM usando una columna de desalaci6n r6pida de Pharmacia equilibrada en el mismo tamp6n. Inmediatamente despu6s de la eluci6n, las fracciones que conten6an prote6na se enfriaron en hielo y se a6adi6 el c6ctel de inhibidor de la proteasa (Calbiochem). Despu6s se a6adieron los reactivos de biotinilaci6n: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado hasta un pH de 8),  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM y 5  $\mu\text{g/ml}$  de enzima BirA (purificado de acuerdo con O'Callaghan y col. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). Despu6s se dej6 incubar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche.

Las mol6culas de pHLA-A\*2402 biotiniladas se purificaron usando cromatograf6a de filtraci6n en gel. Una columna Pharmacia Superdex 75 HR 10/30 se pre-equilibr6 con PBS filtrado y se carg6 1 ml de la mezcla de reacci6n de biotinilaci6n y la columna se desarroll6 con PBS a 0,5 ml/min. Las mol6culas de pHLA-A\*0201 biotiniladas eluyeron en forma de un 6nico pico a aproximadamente 15 ml. Las fracciones que conten6an prote6na se agruparon, enfriaron en hielo y se a6adi6 el c6ctel de inhibidor de la proteasa. La concentraci6n de prote6na se determin6 usando un ensayo de uni6n con Coomassie (PerBio) y al6cuotas de mol6culas de VYGFVRACL-HLA-A\*2402 biotiniladas se almacenaron congelados a  $-20^\circ\text{C}$ . La estreptavidina se inmoviliz6 mediante procedimientos est6ndar de acoplamiento de amina.

Dichos complejos inmovilizados pueden unirse tanto a los receptores de linfocitos T como al co-receptor CD8 $\alpha\alpha$ , los cuales pueden inyectarse en la fase soluble. La uni6n espec6fica del TCR se obtiene incluso a concentraciones bajas (al menos 40  $\mu\text{g/ml}$ ), implicando que el TCR es relativamente estable. Se ha observado que las propiedades de uni6n a pMHC del sTCR eran cualitativa y cuantitativamente similares si el sTCR se usa en la fase soluble o en la fase inmovilizada. Este es un importante control de la actividad parcial de especies solubles t tambi6n sugiere que los complejos de pMHC biotinilados son biol6gicamente tan activos como los complejos no biotinilados.

Las interacciones entre los TCR de VYG-A24 parental que contienen un nuevo enlace entre cadenas y su pMHC af6n o una combinaci6n irrelevante de pMHC, cuya producci6n se describe con anterioridad, se analizaron en un biosensor de resonancia en plasm6n superficial (RPS) Biacore 3000<sup>TM</sup>. Los cambios en las medidas en SPR en el 6ndice de refracci6n se expresaron en unidades de respuesta (UR) cerca de una superficie sensora dentro de una celda de flujo peque6o, un principio que se puede usar para detectar interacciones receptor-ligando y para analizar sus par6metros de afinidad y cin6ticos. Las celdas de flujo sonda se prepararon mediante inmovilizaci6n de los complejos pept6dicos HLA-A2 individuales en c6lulas de flujo aparte mediante la uni6n entre la biotina reticulada en  $\beta 2\text{m}$  y estreptavidina que han sido reticuladas qu6micamente con la superficie activada de las celdas de flujo. Despu6s se realiz6 el ensayo pasando el sTCR sobre las superficies de diferentes celdas de flujo a un caudal constante y midiendo la respuesta en SPR al hacerlo.

#### *Para medir la constante de uni6n en el equilibrio*

Se prepararon diluciones seriadas del TCR de VYG-A24 parental y se inyectaron a un caudal constante de 5  $\mu\text{l min}^{-1}$  sobre dos celdas de flujo diferentes; una revestida con  $\sim 1000$  UR del complejo VYGFVRACL-HLA-A\*2402 espec6fico, la segunda revestida con  $\sim 1000$  UR del complejo HLA-A24-p6ptido inespec6fico. La respuesta se normaliz6 para cada concentraci6n usando la medici6n desde la celda control. La respuesta de los datos normalizados se represent6 frente a la concentraci6n de la muestra de TCR y se ajust6 a un hip6rbola con el fin de calcular la constante de uni6n en el equilibrio,  $K_D$ . (Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2<sup>a</sup> Edici6n) 1979, Clarendon Press, Oxford).

#### *Para medir los par6metros cin6ticos*

Para los TCR de alta afinidad se puede determinar la  $K_D$  midiendo experimentalmente la constante de la velocidad de disociaci6n,  $k_d$ , y la constante de la velocidad de asociaci6n,  $k_a$ . La constante en el equilibrio  $K_D$  se calcul6 como  $k_d/k_a$ . Se puede inyectar el TCR sobre dos celdas diferentes, una revestida con  $\sim 300$  UR del complejo HLA-A\*2402-VYGFVRACL espec6fico, la segunda revestida con  $\sim 300$  UR del complejo p6ptido-HLA inespec6fico. El caudal se fija a 50  $\mu\text{l/min}$ . Normalmente se inyectan 250  $\mu\text{l}$  del TCR a una concentraci6n de  $\sim 3$   $\mu\text{M}$ . Despu6s, se hace fluir el tamp6n hasta que la respuesta retorna a su valor basal. Los par6metros cin6ticos se calculan usando el software Biaevaluation. La fase de disociaci6n tambi6n se ajusta a una ecuaci6n sencilla de deterioro exponencial que permite el c6lculo de la semivida.

#### *Resultados*

La interacción entre un TCR VYG-A24 parental unido con puentes disulfuro (que consiste en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR unidas por puentes disulfuro detalladas en las SEC ID N° 15 y 16 respectivamente) y el complejo VYGFVRACL-HLA-A\*2402 se analizó usando los procedimientos anteriores y se demostró una  $K_D$  de 4  $\mu$ M. (Véase en la Figura 9 la curva de respuesta Biacore).

5 **Ejemplo 5- Producción de una proteína de fusión de TCR soluble VYG-A24-IL-2 humana silvestre**

Los procedimientos sustancialmente como se han descrito en los Ejemplos 1 a 3 se pueden usar para producir una proteína de fusión TCR VYG-A24 soluble-IL-2 humana silvestre. Brevemente, el ADN que codifica el ligador deseado y una IL-2 humana silvestre se añaden en el extremo 3' de la secuencia de ADN de la cadena beta del TCR soluble de VYG-A24 unido por puentes disulfuro. La Figura 8 proporciona la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende una cadena beta del TCR VYG-A24 parental unido por puentes disulfuro condensada a una IL-2 humana silvestre a través de una secuencia ligadora (SEC ID N° 18) El ligador y la porción de IL-2 de esta proteína de fusión se indican en cursiva y el residuo de cisteína introducido en la cadena beta del TCR se indica mediante sombreado. El ADN que codifica esta construcción se puede ligar después en pGMT7. A continuación, la proteína de fusión TCR soluble de VYG-A24 parental -IL-2 se puede expresar combinando esta proteína de fusión de la cadena beta con la cadena alfa del TCR soluble de VYG-124 parental unido por puentes disulfuro detallada en la Figura 5a (SEC ID N° 15) usando los procedimientos sustancialmente como se ha descrito en el Ejemplo 3.

15 **Ejemplo 6-Aislamiento de un TCR de unión a HLA-A24- VYGFVRACL de una biblioteca de expresión en fagos derivada de TCR A6**

Se creó una biblioteca de TCR de expresión en fagos usando los procedimientos descritos en el documento 2004/044004. Brevemente, la biblioteca se basó en un TCR A6 soluble unido por puentes disulfuro específico de HLA-A2-LLFGYPVYV. La diversidad de la biblioteca de TCR A6 se creó usando cebadores mutagénicos que introdujeron mutaciones en las regiones CDR3 de los TCR A6 expresados. Con el fin de expresar la biblioteca de TCR A6 se construyeron vectores fagemidos para la expresión de las proteínas de fusión que comprenden el TCR A6 heterodimérico que contiene un enlace intercatenario disulfuro no nativo con la proteína de la cubierta del fago gIII. Se usaron células XL-1-Blue de E. coli que contenían un fagemido que codifica la cadena  $\alpha$  del TCR soluble A6 y una cadena P del TCR A6 condensada con la proteína gIII del fago para expresar los TCR expresados en los fagos. La presencia de TCR de unión a VYGFVRACL-HLAA\* 2402 funcionales presentados sobre las partículas de fago se detectó usando un método de ELISA para fagos. El ADN que codifica los TCR expresados en fagos que se seleccionaron mediante el ELISA se usaron después para construir TCR solubles unidos por puentes disulfuro. La unión de estos TCR solubles a HLA-A24- VYGFVRACL se evaluó después usando el método Biacore del Ejemplo 4 del presente documento. El TCR de VYG-A24 parental unido por puentes disulfuro se construyó usando una cadena  $\beta$  de TCR aislada de esta biblioteca (SEC ID N° 16) asociada con un análogo soluble unido por puentes disulfuro de una cadena  $\alpha$  del TCR "silvestre" de unión a ILAKFLHWL - HLA-A\*0201 (SEC ID N° 15). La cadena  $\alpha$  del TCR mostrada en la Figura 10b (SEC ID N° 20) también se aisló a partir de esta biblioteca, se mostró como un  $\alpha\beta$ TCR específico del complejo VYGFVRACL-HLA-A\*2402, en combinación con la cadena  $\beta$  del TCR mostrada en la Figura 5b (SEC ID N° 16).

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse específicamente a VYGFVRACL-HLAA24, **que se caracteriza porque** la región variable de la cadena alfa de los TCR tiene la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 19 y la región variable de la cadena beta del TCR tiene la SEC ID N° 3.
- 5 2.- Un receptor de linfocitos T (TCR) de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la propiedad de unirse específicamente al péptido VYGFVRACL derivado de la telomerasa presentado en el contexto del subtipo HLA-A\*2402.
- 3.- Un TCR de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una cadena alfa de la SEC ID N° 15 y una cadena beta de la SEC ID N°: 16.
- 10 4.- Un TCR de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una cadena alfa de la SEC ID N° 20 y una cadena beta de la SEC ID N°: 16.
- 5.- Un TCR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes asociado con un agente terapéutico o un resto detectable.
- 6.- Un TCR de acuerdo la reivindicación 5, en el que el TCR está covalentemente unido a un agente terapéutico o un resto detectable.
- 15 7.- Un complejo de TCR multivalente, que comprende al menos dos TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 8.- Una célula presentadora de un TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 9.- Una célula transfeccionada para presentar un TCR como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 10.- Una célula de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que es un linfocito T humano o una célula madre hematopoyética humana.
- 11.- Un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican un TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 12.- Una composición farmacéutica que comprende un TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un complejo de TCR multivalente de acuerdo con la reivindicación 7, o una pluralidad de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, o un ácido nucleico o ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 11, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 13.-El uso de un TCR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un complejo de TCR multivalente de acuerdo con la reivindicación 7, o una pluralidad de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, o un ácido nucleico o ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 11, en la preparación de una composición para el tratamiento del cáncer.

Figura 1a

10 20  
\* \*  
M K N Q V E Q S P P D L I L Q E G A N S T L R C N F S D S

30 40 50  
\* \* \*  
V N N L Q W F H Q N P W G Q L I N L F Y I P S G T K Q N G

60 70 80  
\* \* \*  
R L S A T T V A T E R Y S L L Y I S S S Q T T D S G V Y F

90 100 110  
\* \* \*  
C A V D S A T S G T Y K Y I F G T G T R L K V L A N  
(SEC ID N° 2)

Figura 1b

10 20  
\* \*  
M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N

30 40 50  
\* \* \*  
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q

60 70 80  
\* \* \*  
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T

90 100 110  
\* \* \*  
S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T  
(SEC ID N° 3)

Figura 2a

tatacatatgaaaaaccaagtggagcagagtctccagacctgattctccaggaggagccaattccacgctgcggtgcaa  
ttttctgactctgtgaacaatttcagtggttcatcaaaaccttggggacagctcatcaacctgtttacattccctcagggac  
aaaacagaatggaagattaagcgccacgactgtcgtctacggaacgctacagcttattgtacattcctcttcccagaccacag  
actcaggcggttatttctgtgctgtggactctgctacctcaggaacctacaatacatctttggaacaggcaccaggctgaagg  
tttagcaaatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagtctgtctgcctattca  
ccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaagaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtc  
tatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta  
ttcagaagacaccttctccccagcccagaaagttcc

(SEC ID N° 9)

Figura 2b

tatacatatgaatgctggtgtaactcaaacacaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgacactgcagtgctgcc  
caggatatgaacatgaatacatgtcctggtatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgc  
tggtatcactgaccaaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgcctcaggctgctg  
tcggctgctccctccagacatctgtgtacttctgtgccgctgagccttctgcggaggggaaggttacttcgggccgggcac  
caggctcacggtcacagaggacctgaaaaactgttcccaccgaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctc  
ccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccaccggttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatg  
ggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagaccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatac  
ctctgagcagccgctgagggtctcggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctac  
ggctctcggagaatgacgagtgaccaggataggccaaacctcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggta  
gagcagactaagcttgaattc

(SEC ID N° 10)

Figura 3a

M K N Q V E Q S P P D L I L Q E G A N S T L R C N F S D S  
V N N L Q W F H Q N P W G Q L I N L F Y I P S G T K Q N G  
R L S A T T V A T E R Y S L L Y I S S S Q T T D S G V Y F  
C A V D S A T S G T Y K Y I F G T G T R L K V L A N I Q N  
P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N  
V S Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A  
V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P  
E S S

(SEC ID N° 11)

Figura 3b

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N  
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q  
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T  
S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T E D L  
K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L  
A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q  
P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P  
R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q  
I V S A E A W G R A D

(SEC ID N° 12)

Figura 4a

tatacatatgaaaaaccaagtggagcagagtctccagacctgattctccaggagggagccaattccacgctgcggtgcaa  
ttttctgactctgtgaacaatttgagtggttcatcaaaaccttggggacagctcatcaacctgtttacattccctcagggac  
aaaacagaatggaagaffaagcgccacgactgtcgctacggaacgctacagcttattgtacattctcttccagaccag  
actcaggcgttfatttctgtgctgtggactctgctacctcaggaacctacaatacatctttggaacaggcaccaggctgaagg  
tttagcaaatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagtctgtctgcctattca  
ccgatttgattctcaacaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaatggtgctagacatgaggtc  
tatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta  
ttcagaagacaccttcttcccagcccagaaagtcc

(SEC ID N° 13)

Figura 4b

tatacatatgaatgctggtgtaactcaaacaccaaattccaggctctgaagacaggacagagcatgacactgcagtgtgcc  
caggatatgaacctgaatacatgtcctggatcgaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagtgggtgc  
tggatcactgaccaaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgcctcaggctgctg  
tcggctgctccctccagacatctgtgtacttctgtccgctgagccttctgcggaggggaaggttacttcgggccgggcac  
caggctcacggtcacagaggacctgaaaaactgttcccaccgaggtcgtgtgttgagccatcagaagcagagatctc  
ccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccaccggttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatg  
ggaaggaggtgcacagtgggtgtgcacagaccgagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatacg  
ctctgagcagccgctgagggtctcggccaccttctggcaggacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacg  
ggctctcggagaatgacgagtggaaccaggataggccaaaccgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggta  
gagcagactaagcttgaattc

(SEC ID N° 14)

Figura 5a

M K N Q V E Q S P P D L I L Q E G A N S T L R C N F S D S  
V N N L Q W F H Q N P W G Q L I N L F Y I P S G T K Q N G  
R L S A T T V A T E R Y S L L Y I S S S Q T T D S G V Y F  
C A V D S A T S G T Y K Y I F G T G T R L K V L A N I Q N  
P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N  
V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S M D F K S N S A  
V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P  
E S S

(SEC ID N° 15)

Figura 5b

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N  
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q  
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T  
S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T E D L  
K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L  
A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V C T D P Q  
P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P  
R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q  
I V S A E A W G R A D

(SEC ID N° 16)

Figura 6a

I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T  
D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K  
(SEC ID N° 4)

Figura 6b

E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T  
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V  
(SEC ID N° 5)

Figura 6c

E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T  
L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V  
(SEC ID N° 6)

Figura 7a

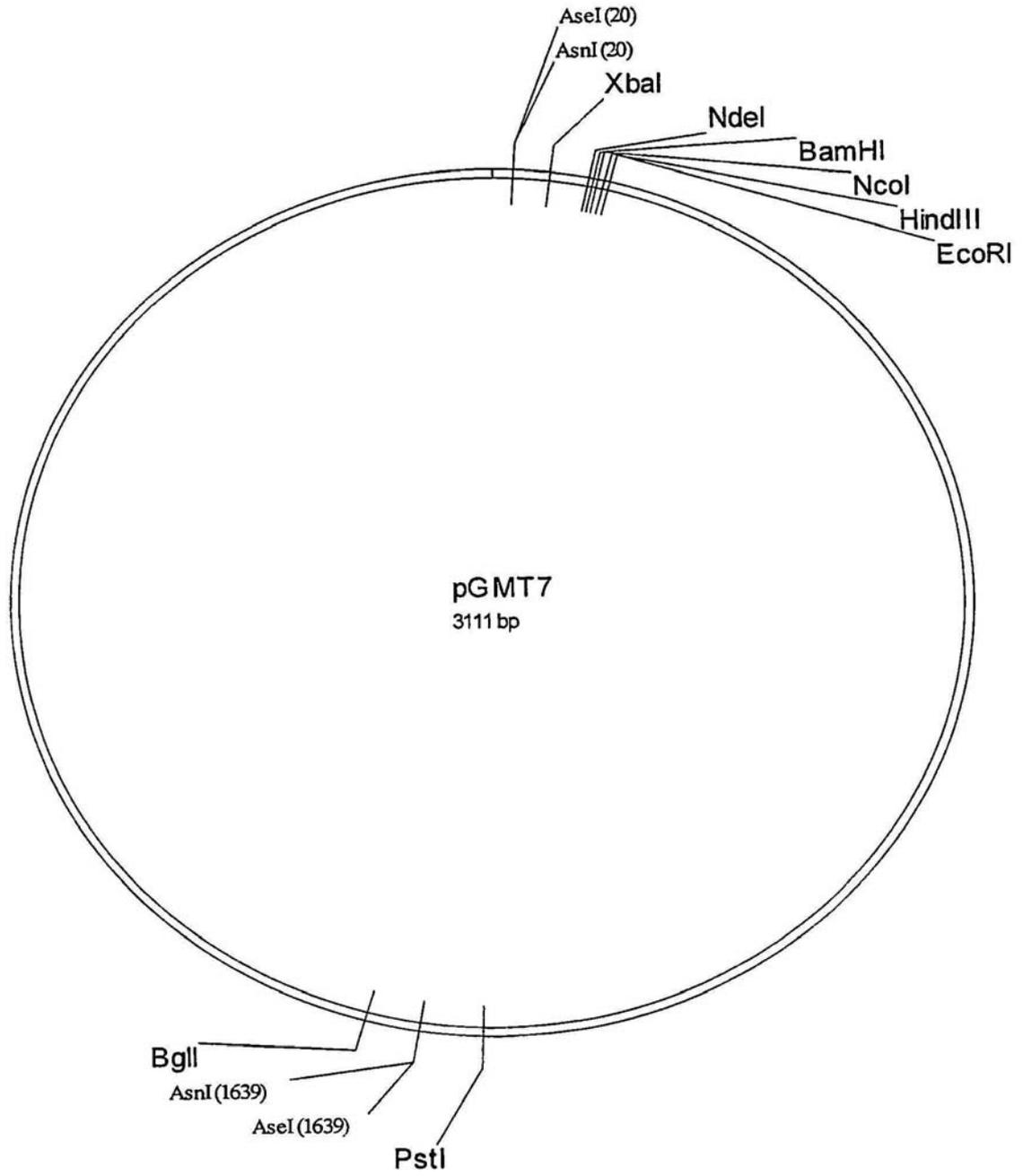


Figura 7b

```

1  GATCTCGATC CCGCGAAATT AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG
51  GTTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA GATATACATA
101 TGGGATCCAT GGTAAGCTTG AATTCCGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA
151 AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC TGCCACCGCT GAGCAATAAC TAGCATAACC
201 CCTTGGGGCC TCTAAACGGG TCTTGAGGGG TTTTTTGCTG AAAGGAGGAA
251 CTATATCCGG ATAATTCTTG AAGACGAAAG GGCCTCGTGA TACGCCTATT
301 TTTATAGGTT AATGTCATGA TAATAATGGT TTCTTAGACG TCAGGTGGCA
351 CTTTTCGGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTATT TTTCTAAATA
401 CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA
451 ATAATATTTT GTTAAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT
501 TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA
551 GACCGAGATA GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT
601 TAAAGAACGT GGACTCCAAC GTCAAAGGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC
651 GATGGCCAC TACGTGAACC ATCACCCTAA TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG
701 GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC CGATTTAGAG
751 CTTGACGGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG
801 AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT
851 AACACCACA CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC GCGTCAGGTG
901 GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTCTAA
951 ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCCT GATAAATGCT
1001 TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTFCG
1051 CCCTTATTCC CTTTTTTGCG GCATTTTGCC TTCCTGTTTT TGCTCACCCA
1101 GAAACGCTGG TGAAAGTAAA AGATGCTGAA GATCAGTTGG GTGCACGAGT
1151 GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG TAAGATCCTT GAGAGTTTTC
1201 GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT TCTGCTATGT
1251 GGCGCGGTAT TATCCCCTGT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTCGCCG
1301 CATACTAT TCTCAGAATG ACTTGGTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA
1351 AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG AATTATGCAG TGCTGCCATA
1401 ACCATGAGTG ATAACACTGC GGCCAACTTA CTTCTGACAA CGATCGGAGG
1451 ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA CATGGGGGAT CATGTAACTC
1501 GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC AAACGACGAG
1551 CGTGACACCA CGATGCCTGC AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAACTATT
1601 AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCC GCAACAATTA ATAGACTGGA
1651 TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC TGCGCTCGGC CCTTCCGGCT
1701 GGCTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG GGTCTCGCGG
1751 TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA
1801 TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA TAGACAGATC
1851 GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT
1901 TTACTCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA
1951 GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA AATCCCTTAA
2001 CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG
2051 ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA

```

## Figura 7b (cont.)

2101 AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTG TGCCGGATCA AGAGCTACCA  
 2151 ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC  
 2201 TGTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG  
 2251 CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC  
 2301 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC  
 2351 GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA  
 2401 GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA  
 2451 TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT  
 2501 AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA  
 2551 ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCGGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG  
 2601 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC  
 2651 CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTTGCTGG CTTTTTGCTC  
 2701 ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC  
 2751 GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG  
 2801 CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG TATTTTCTCC  
 2851 TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA ATGGTGC ACTCAGTACAA  
 2901 TCTGCTCTGA TGCCGCATAG TTAAGCCAGT ATACACTCCG CTATCGCTAC  
 2951 GTGACTGGGT CATGGCTGCG CCCCACACCG CGCCAACACC CGCTGACGCG  
 3001 CCCTGACGGG CTTGTCTGCT CCCGGCATCC GCTTACAGAC AAGCTGTGAC  
 3051 CGTCTCCGGG AGCTGCATGT GTCAGAGGTT TTCACCGTCA TCACCGAAAC  
 3101 GCGCGAGGCA G

(SEC ID N° 17)

Figura 8

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N  
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q  
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T  
S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T E D L  
K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L  
A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V C T D P Q  
P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P  
R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q  
I V S A E A W G R A D P G A P T S S S T K K T Q L Q L E H  
L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y  
M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q  
S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F  
M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L  
T

(SEC ID N° 18)

Figura 9

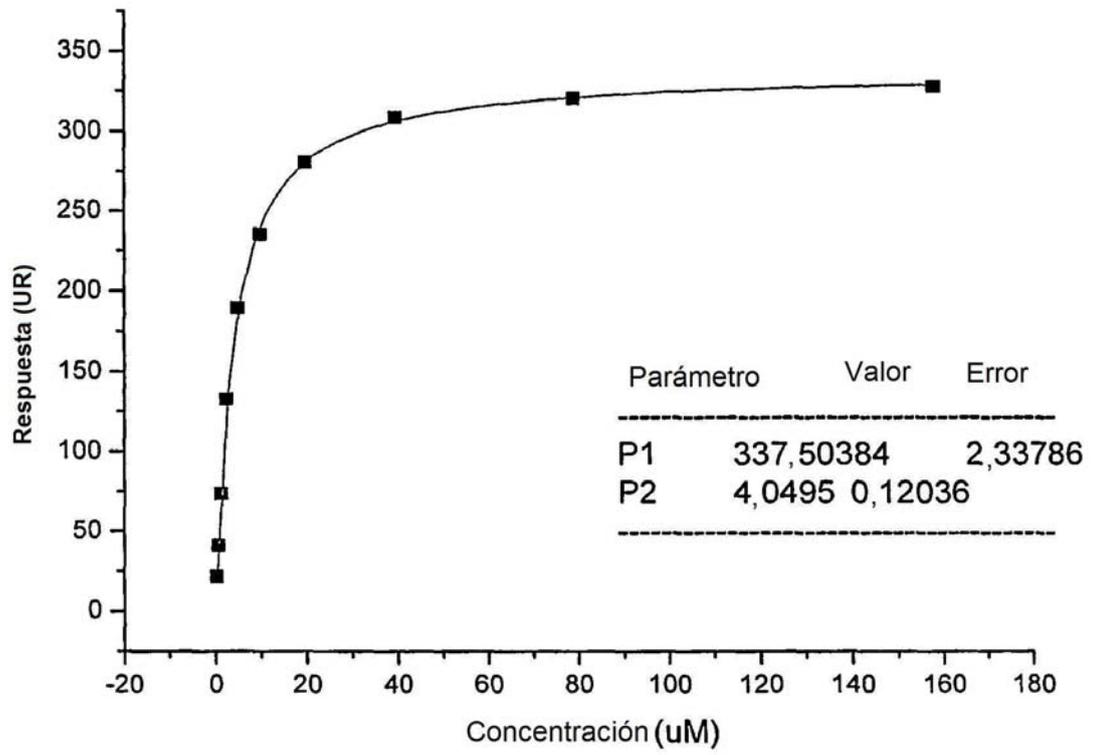


Figura 10a

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSN  
GDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLTRDSQPSDSATYLCAQSQCTENQFGAGTQV  
VVTPD

(SEC ID N° 19)

Figura 10b

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSN  
GDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLTRDSQPSDSATYLCAQSQCTENQFGAGTQV  
VVTPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCV  
LDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI IPEDTFFPSPSS

(SEC ID N° 20)