

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 180**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2009 E 09760145 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **10.08.2011 EP 2352756**

54 Título: **Receptor de células T de alta afinidad y uso del mismo**

30 Prioridad:

24.11.2008 EP 08020396

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2013

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND
UMWELT GMBH (50.0%)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg, DE y
MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE
MEDIZIN (MDC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHENDEL, DOLORES;
WILDE, SUSANNE;
FRANKENBERGER, BERNHARD y
UCKERT, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 394 180 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

Receptor de células T de alta afinidad y uso del mismo

- 5 **[0001]** La presente invención va dirigida a un receptor de células T (TCR) de alta afinidad frente a un antígeno asociado a tumores, una molécula de ácido nucleico aislada que lo codifica, una célula T que expresa dicho TCR y una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican presencia de células neoplásicas que expresan dicho antígeno asociado a tumores.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 **[0002]** Los TCR son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y, normalmente, constan de dos subunidades, denominadas subunidades α y β . Estas poseen un dominio variable (V) de inmunoglobulina (Ig) N-terminal, un dominio constante (C) de Ig, una región transmembrana/que abarca la membrana celular y un tallo citoplásmico corto en el extremo C terminal. Los dominios variables de ambas cadenas α y β del TCR tienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) o hipervariables, mientras que la región variable de la cadena β tiene un área adicional de hipervariabilidad (HV4) que normalmente no entra en contacto con el antígeno y, por tanto, no se considera una CDR.

- 20 **[0003]** CDR3 es la principal CDR responsable del reconocimiento del antígeno procesado, aunque también se ha demostrado que la CDR1 de la cadena alfa interacciona con la parte N-terminal del péptido antigénico, mientras que la CDR1 de la cadena β interacciona con la parte C-terminal del péptido. Se considera que CDR2 reconoce el MHC. La CDR4 de la cadena β no parece participar en el reconocimiento del antígeno aunque se ha demostrado que interacciona con superantígenos. El dominio constante del dominio TCR consta de dos secuencias de conexión
25 cortas en las que un resto de cisteína forma enlaces disulfuro, que forma un enlace entre las dos cadenas.

[0004] La afinidad de los TCR por un antígeno específico los hace valiosos para diversas estrategias terapéuticas. Por ejemplo, los pacientes de cáncer, como aquellos que sufren melanoma, puede ser tratados de forma eficaz usando inmunoterapia adoptiva.

30

- [0005]** La transferencia adoptiva de linfocitos en el entorno del trasplante de células madre (TCM) alogénico ha permitido demostrar la potencia del sistema inmune para erradicar las neoplasias malignas hematológicas (Kolb y col. 1995). Parece que el TCM también funciona en la eliminación de los tumores sólidos, como los carcinomas de células renales (CCR) en algunos casos (revisado en Kolb y col. 2004 y Dudley y Rosenberg, 2003). En los
35 receptores de TCM, la eliminación de células malignas solo puede producirse después de varios meses y hasta un año, debido al hecho de que las células T específicas deben activarse *in vivo* y expandirse a continuación para adecuar los valores siguiendo el desarrollo del nuevo sistema hematopoyético en el receptor del trasplante. Alternativamente, tras un periodo de tiempo (aproximadamente 60 días) durante el cual se establece la tolerancia en el receptor del TCM, puede realizarse una transferencia de linfocitos sin cebar y sin aislar para acelerar la
40 generación de las respuestas inmunitarias dirigidas contra las células tumorales. Una vez más, los linfocitos específicos capaces de atacar a las células tumorales deben activarse y expandirse a partir de los linfocitos precursores de baja frecuencia presentes entre la población no seleccionada de linfocitos que se transfieren. Las perfusiones de linfocitos donantes (PLD) de poblaciones de linfocitos no seleccionados tras el TCM funcionan bien en la eliminación de la leucemia mielogénica crónica (LMC) que crece lentamente, pero es menos eficaz en la
45 erradicación de la leucemia aguda debido en parte al hecho de que el crecimiento de las células malignas supera la capacidad de expansión de las células inmunitarias. Esta misma expansión diferencial en la que las células inmunitarias se expanden más lentamente que las células tumorales, también afecta a la mala eliminación inmunitaria de los tumores sólidos de progresión rápida. Una segunda dificultad en el uso de poblaciones mixtas de linfocitos no seleccionados en la PDL es que también pueden transferirse células T que tienen la capacidad de
50 atacar a células y tejidos normales del receptor, lo que induce la enfermedad injerto contra huésped (GVHD), enfermedad con alta morbimortalidad.

- [0006]** Estudios recientes han demostrado que la transferencia adoptiva de células T seleccionadas con especificidades peptídicas definidas puede llevar a reducciones importantes de la carga del tumor en un entorno
55 autólogo, especialmente si los pacientes han sido tratados previamente con regímenes no mieloablativos (Dudley y col. 2002, 2003). Esto elimina la necesidad de realizar TCM en el paciente afectado por el tumor y también evita, por tanto, el problema de la GVHD.

- 5 **[0007]** Para extender la capacidad de utilizar la terapia celular adoptiva (TCA) para tratar a pacientes con tumores que crecen más rápidamente, el objetivo es transferir células T efectoras específicas de péptido enriquecidas (tanto células T auxiliares CD4 como linfocitos T citotóxicos) que se han seleccionado por sus especificidades por el ligando para atacar de forma eficaz a las células tumorales a la vez que se evita un ataque grave de los tejidos normales. Estas células se expanden rápidamente hasta obtener grandes cantidades *ex vivo* y, a continuación, se usan para TCA. Alternativamente, los receptores de células T (TCR) de estas células T específicos de ligando pueden clonarse y expresarse como transgenes de TCR en linfocitos activados, usando linfocitos de sangre periférica receptores o clones de células T activados con especificidades definidas que crecen bien y no tienen la capacidad de atacar a los tejidos normales del huésped.
- 10 **[0008]** Como ejemplo, un clon de células T aloespecífico expandido que es específico para una molécula de MHC no expresada por el receptor o un clon de células T expandido específico de un virus, como citomegalovirus o virus del Epstein-Barr, podrían usarse como células receptoras para el TCR transgénico. La disponibilidad de un panel de vectores transgénicos de TCR, que reconocen diferentes ligandos de MHC-péptido diferentes podrían usarse para desarrollar una cantidad grande de células T preactivadas de subtipos CD4 y CD8, permitiendo de este modo grandes cantidades de linfocitos efectoras que se preparan rápidamente y se transfieren a pacientes cuyos tumores expresan los ligandos de TCR correspondientes. Esto podría ahorrar tiempo a la hora de conseguir las cantidades de células T específicas necesarias para controlar el crecimiento del tumor, lo que posiblemente llevaría a una erradicación del tumor más eficaz en tumores que progresan rápidamente.
- 15 **[0009]** Debido a que los determinantes que reconocen células T específicas de leucemia y de linfomas, así como células de tumores sólidos, a menudo representan péptidos propios derivados de proteínas sobreexpresadas presentadas por moléculas propias de MHC, la afinidad de sus receptores de células T (TCR) es bajo, ya que las células T portadoras de receptores de alta afinidad se han eliminado mediante el proceso de selección negativa que se aplica a los linfocitos durante su desarrollo en el timo para prevenir la autoinmunidad. Se produce un reconocimiento de más eficaz de las células tumorales si las células T se generan a partir de linfocitos que no se han seleccionado negativamente contra moléculas propias de MHC durante su desarrollo en el timo.
- 25 **[0010]** El documento WO 2006/031221 se refiere a receptores de células T frente a antígenos asociados a tumores, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células que contienen los ácidos nucleicos que codifican los receptores de células T y procedimientos para su uso. Entre otros, se describe que las subunidades de TCR tienen la capacidad de formar un TCR que confiera especificidad a células T por las células tumorales que presenten MART-I, NY-ESO-I y gp100 relacionada con melanoma.
- 30 **[0011]** En la técnica previa, existen varios documentos científicos y patentes en las que se describen TCR capaces de reconocer y unirse a la tirosinasa. Visseren y col. (Int. J. Cancer (1997) 72, 1122 – 1128) describen la afinidad y especificidad de diversos TCR específicos de tirosinasa y sugieren el uso de estos TCR como tratamiento específico de los pacientes con melanoma.
- 35 **[0012]** Roszkowski y col. (J. Immunol. (2003) 170, 2582 – 2589 y Cancer Res. (2005) 65, 1570 – 1576) de forma similar caracterizan TCR específicos de tirosinasas.
- 40 **[0013]** El documento US 5.906.936 está dirigido a células T citotóxicas que matan a células diana no restringida por MHC y no a otras células, que comprenden secuencias de TCR específicas.
- 45 **[0014]** El documento WO97/32603 está dirigido a un procedimiento para producir TCR no humanos y TCR específicos para antígenos tumorales restringidos por el HLA humano. Adicionalmente, se describen los ácidos nucleicos de TCR y las células T recombinantes así como la administración de células T con TCR recombinantes para el tratamiento de diversas enfermedades.
- 50 **[0015]** En el documento WO2007/065957 se describe una célula T efectora transfectada con un ARN que codifica un TCR específico de antígeno en el que la célula T transfectada reconoce el antígeno dentro de un complejo con la molécula de MHC y se une a este. Como posible antígeno se nombran MART-1 (Melan-A), tirosinasa y survivina.
- 55 **[0016]** En el documento WO2008/039818 se describen secuencias de TCR específicos de MART-1 y tirosinasa, y se describe la mejora del reconocimiento del antígeno mediante su sustitución en la región CDR2.

[0017] Las secuencias de TCR de la técnica previa derivan todas de fuentes autólogas o xenogénicas pero no alogénicas.

5 **[0018]** Por ejemplo, las secuencias del TCR provienen de linfocitos de sangre periférica o infiltrantes tumorales de pacientes con melanoma positivos para HLA-A2. Esto significa que todos estos TCR son TCR restringidos por HLA-A2 o, están restringidos por HLA-DP4, específico de NY-ESO-1, derivados ambos de fuentes autólogas. Como alternativa, como se describe en el documento WO97/32603, el TCR deriva de un ratón transgénico para HLA-A2, por lo que la secuencia es xenogénica. Sin embargo, los documentos de la técnica previa
10 disponibles no muestran secuencias de TCR que estén alorrestringidas y tengan especificidad por la tirosinasa.

[0019] Por tanto, sigue existiendo una necesidad importante de encontrar sistemas para generar células T portadoras de TCR con una alta avidez funcional que tengan la capacidad de reconocer ligandos específicos en las células tumorales. Aunque la trasferencia adoptiva de células T que expresan receptores de células T (TCR)
15 transgénicos con función antineoplásica es una nueva terapia esperanzadora para pacientes con tumores avanzados; existe un cuello de botella crítico en la identificación de células T de alta avidez con especificidades TCR necesarias para tratar neoplasias malignas diferentes.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 **[0020]** Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un TCR o partes funcionales del mismo, como regiones CDR3, que muestren alta afinidad por antígenos asociados a tumores, en particular, la tirosinasa. Es un objeto adicional de la invención proporcionar composiciones farmacéuticas para su uso en terapia celular adoptiva que permitan un tratamiento eficaz de enfermedades que implican la presencia de células malignas que
25 expresan tirosinasa, preferiblemente melanomas, gliomas, glioblastomas y/o tumores raros de origen ectodérmico

[0021] Estos objetos se resuelven mediante la materia de las reivindicaciones independientes. En las reivindicaciones dependientes se indican las realizaciones preferidas.

30 **[0022]** Los inventores pueden aislar TCR específicos para el antígeno asociado al melanoma, la tirosinasa, y se puede demostrar que los TCR derivados del clon alorrestringido son superior en el reconocimiento de un péptido específico y de células tumorales tras su expresión como transgenes en los linfocitos receptores. Por tanto, podrían identificarse TCR y partes funcionales de los mismos, como las regiones CDR3, que puedan aplicarse en terapia celular adoptiva para el tratamiento de diversas neoplasias malignas.

35 **[0023]** Durante años se han publicado diversos clones de células T con especificidad por diversos antígenos asociados a tumores (véase anteriormente). La mayoría de estos TCR están restringidos a moléculas de MHC propias. Sin embargo, las secuencias de TCR descritas en este documento, están alorrestringidas y muestran alta avidez de reconocimiento de sus ligandos específicos. Los TCR de la presente invención no están restringidos por el propio MHC y, por tanto, tienen una afinidad estructural mayor para las interacciones con ligandos de los complejos MHC-péptido que se dirigen a las células tumorales a través de proteínas propias sobreexpresadas comunes. Como se destacará en los ejemplos, los TCR de la presente invención se derivaron a partir de un clon de células T generado mediante cebado de células T CD8* con células dendríticas autólogas de un donante negativo para HLA-A2 que expresaba conjuntamente moléculas de HLA-*A0201 alogénico y un antígeno. Como resultado, los TCR
40 actuales tienen uso terapéutico para el tratamiento de pacientes positivos para HLA-A2.

[0024] En más detalle, las respuestas de las células T frente a los tumores se dirigen a menudo a moléculas de MHC propias que presentan péptidos derivados de proteínas propias sobreexpresadas. En general, las células T con alta avidez por ligandos de complejos péptido/MHC propios se eliminan por selección negativa para prevenir
50 casos de autoinmunidad. La afinidad de los TCR de las células T remanentes específicos de ligandos propios es, normalmente baja, no obstante son necesarias células T con alta avidez para eliminar los tumores de forma eficaz. Debido a que la selección negativa se limita a moléculas de MHC propias, las células T que reconoce moléculas de MHC alogénicas no sufren selección negativa. Sin embargo, como se describen en la presente invención, si los péptidos se presentan en el contexto de moléculas de MHC alogénico, es posible obtener células T de alta avidez
55 específicas de ligandos comunes asociados a tumores derivados de proteínas propias sobreexpresadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 **[0025]** Según un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica las regiones V(D)J de un TCR que reconoce un antígeno tumoral y comprende la secuencia de ácido nucleico SEC ID N.º 1 que codifica la cadena α y/o comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.º 2 que codifica la cadena β de dicho TCR.

10 **[0026]** Por tanto, un TCR de la presente invención y una secuencia de ácido nucleico que codifica el mismo puede comprender sólo una de las secuencias de la cadena α o la cadena β según se define anteriormente en este documento (en combinación con una cadena α o cadena β adicional, respectivamente) o puede comprender ambas cadenas.

15 **[0027]** El término «ácido nucleico» según se usa en este documento con referencia a ácidos nucleicos se refiere a un ácido nucleico natural que no está inmediatamente contiguo a ambas secuencias con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma natural de la célula de la que deriva. Por ejemplo, un ácido nucleico puede, sin limitaciones, ser una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, siempre que se haya eliminado o esté ausente una de las secuencias de ácido nucleico que normalmente se encuentran flanqueando inmediatamente esta molécula de ADN recombinante en un genoma natural. Por tanto, un ácido nucleico incluye, sin limitaciones, un ADN recombinante que existe como molécula aislada (p. ej., un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con una endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias así como un ADN recombinante que se incorpora a un vector, un plásmido de replicación autónoma o un virus (p. ej., un retrovirus o un adenovirus). Además, un ácido nucleico aislado puede incluir una molécula de ADN recombinante que es parte de una secuencia de ácido nucleico híbrido o de fusión.

25 **[0028]** Además, el término «ácido nucleico» según se usa en este documento también incluye secuencias de ADN o ARN producidas artificialmente, como aquellas secuencias generadas mediante síntesis de ADN en base a la información *in silico*.

30 **[0029]** Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender nucleótidos naturales, nucleótidos modificados, análogos de nucleótidos o mezclas de los anteriores siempre que sean capaces de permitir la expresión de un polipéptido *in vitro* y, preferiblemente, en una célula T. Los ácidos nucleicos de la invención son, preferiblemente, ARN y, más preferiblemente, ADN.

35 **[0030]** Además, la presente invención también comprende derivados de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente en las que, en relación a las SEC ID N.º 1 y 2 anteriores, se ha alterado la secuencia mediante adiciones, deleciones y/o sustituciones y en las que se mantiene o mejora el reconocimiento del antígeno tumoral. En otras palabras, se mantienen al menos las características de reconocimiento del antígeno tumoral.

40 **[0031]** Con más precisión, este derivado codifica la cadena α o la cadena β , donde la cadena se ha alterado mediante una o más adiciones o deleciones de 1 – 15 aminoácidos, estando las adiciones o deleciones fuera de la región CDR3 de cada cadena y/o mediante sustituciones conservadoras de 1 – 15 aminoácidos. En conexión con esto, es de apreciar que también puede alterarse la región CDR3, pero en menos grado. La definición de estas modificaciones se indican a continuación para los derivados de fragmentos que codifican la región CDR3.

45 **[0032]** Los cambios útiles en la secuencia completa del ácido nucleico en particular se relacionan con la optimización de codones y la adición de etiquetas epítopes, que se explicarán en detalles a continuación. Esta optimización de codones puede incluir optimización de los niveles de expresión, optimización de la avidéz por las células diana o ambas.

50 **[0033]** En general, se apreciará, sin embargo, que las alteraciones no deberían disminuir ni alterar la capacidad del polipéptido codificado para formar parte de un TCR que reconozca antígenos asociados al tumor en el contexto de un antígeno MHC, aunque debería facilitarse la destrucción de una célula cancerosa y, preferiblemente, facilitarse la regresión de un tumor, u otro estado canceroso.

55 **[0034]** Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones que lleven a sustituciones conservadores dentro de la secuencia de aminoácidos expresada. Estas variaciones pueden hacerse en regiones determinantes de complementariedad y no determinantes de complementariedad de la secuencia de aminoácidos de la cadena del TCR que no afectan a la función. Sin embargo, como se apunta anteriormente, no deberían realizarse adiciones ni deleciones en la región CDR3 (por ejemplo, una adición de etiquetas de epítope).

60

- [0035]** El concepto de «sustituciones de aminoácidos conservadoras» es conocido para el experto en la técnica y, preferiblemente, significa que los codones que codifican restos cargados positivamente (H, K y R) se sustituyen por codones que codifican restos cargados positivamente, los codones que codifican restos cargados negativamente (D y E) se sustituyen por codones que codifican restos cargados negativamente, los codones que
 5 codifican restos polares neutros (C, G, N, Q, S, T e Y) se sustituyen por codones que codifican restos polares neutros o los codones que codifican restos no polares neutros (A, F, I, L, M, P, V y W) se sustituyen por codones que codifican restos no polares neutros. Estas variaciones pueden producirse de forma espontánea e introducirse mediante mutagénesis aleatoria o mediante mutagénesis dirigida. Estos cambios pueden hacerse sin destruir las características esenciales de estos polipéptidos, que son reconocer los antígenos antitumorales en el contexto de
 10 una molécula de MHC con alta avidéz permitiendo de este modo la destrucción de las células cancerosas. El experto en la materia puede analizar con facilidad y de forma rutinaria variantes de aminoácidos y/o de ácidos nucleicos que los codifican para determinar si estas variaciones reducen sustancialmente o destruyen la capacidad de unión al ligando mediante procedimientos conocidos en la técnica.
- 15 **[0036]** En una realización adicional, la presente invención proporciona fragmentos de las moléculas de ácido nucleico anteriores, que codifican una región CDR3 de un TCR que reconoce un antígeno tumoral y tienen la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID N.º 3 o 4 o codifican las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N.º 5 o 6. Las alteraciones en la región CDR3 se realizarán según las consideraciones descritas anteriormente.
- 20 **[0037]** La invención además proporciona derivados en los que se ha alterado la región CDR3 mediante una o más adiciones y/o deleciones de un número total de hasta 1 – 5 aminoácidos, pero no más de 1 – 3 aminoácidos contiguos y/o sustituciones conservadores de hasta 1 – 6 aminoácidos y en el que las características de reconocimiento del antígeno tumoral se mantienen o mejoran.
- 25 **[0038]** Esto significa, con más precisión, que pueden realizarse adiciones o deleciones hasta un grado en el que se añadan o delecionen 1 – 5 aminoácidos en la región CDR3. Si a continuación se realiza una adición o deleción, el número total de aminoácidos añadidos o deleccionados no puede exceder de 5 aminoácidos. Adicionalmente, una única adición o deleción en un sitio sólo puede estar en el intervalo de 1 – 3 aminoácidos, es decir, 1 – 3 aminoácidos contiguos, ya que la capacidad de unión al ligando puede deteriorarse realizando
 30 adiciones/deleciones más largas.
- [0039]** Un derivado preferido de la molécula de ácido nucleico que codifica las cadenas α o β de dicho TCR es aquel en el que la secuencia original de las SEC ID N.º 1 y 2 se ha alterado mediante optimización de codones. Un ejemplo preferido de ese derivado que codifica las regiones V(D)J de un TCR que reconoce un antígeno tumoral es
 35 la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N.º 7 que codifica la cadena α y la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N.º 8 que codifica la cadena β de dicho TCR.
- [0040]** La optimización de codones es una técnica genérica para conseguir la expresión óptima de un gen extraño en un sistema celular. La selección de codones óptimos depende del uso del codón del genoma huésped y
 40 de la presencia de diversos motivos de secuencia deseables y no deseables. Se aprecia que la optimización de codones no llevará a una secuencia de aminoácidos alterada y, por tanto, no entrará dentro de la definición de sustitución conservadora contenida en esta solicitud.
- [0041]** En una realización preferida, el antígeno tumoral es la tirosinasa. Las enfermedades neoplásicas que
 45 expresan tirosinasa siguen teniendo una alta incidencia, por ejemplo, se diagnostican cada año en todo el mundo aproximadamente 160.000 nuevos casos de melanoma. Según un informe presentado por la OMS, se producen al año aproximadamente 48.000 muertes relacionadas con el melanoma a nivel mundial. Por tanto, la tirosinasa es un antígeno tumoral adecuado que puede servir como diana para el tratamiento tumoral.
- 50 **[0042]** En un segundo aspecto, la presente invención se dirige a un TCR, preferiblemente un TCR soluble, codificado por una molécula de ácido nucleico como se define anteriormente o que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N.º 5 y/o 6.
- [0043]** Dicho TCR preferiblemente se presenta en forma de proteína de fusión de las cadenas α y/o β de TCR
 55 funcional que comprende:
- a) al menos una etiqueta epítope y
 - b) la secuencia de aminoácidos de una cadena α y/o β de un TCR definida como anteriormente o codificada por una
 60 molécula de ácido nucleico como se señala anteriormente,

donde dicha etiqueta epítope se selecciona entre

5 i) una etiqueta epítope añadida a los extremos N y/o C terminales de dichas cadenas α y/o β , o añadida en la secuencia de las cadenas α y/o β , pero fuera de la región CDR3.

ii) una etiqueta epítope insertada en una región constante de dichas cadenas α y/o β y

10 iii) una etiqueta epítope que sustituye a varios aminoácidos de la región constante de dichas cadenas α y/o β .

10 **[0044]** Las etiquetas epítopes son extensiones de aminoácidos cortas que pueden hacer que se sintetice un anticuerpo específico lo que, en determinadas realizaciones, permite su identificación específica y el seguimiento en la proteína etiquetada añadida a un organismo vivo o a células en cultivo. La detección de la molécula etiquetada puede conseguirse usando diversas técnicas. Entre los ejemplos de estas técnicas se incluyen: inmunohistoquímica, 15 inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, ELISA, inmunotransferencia (transferencia de tipo «western») y cromatografía de afinidad. Las etiquetas epítope añaden un epítope conocido (sitio de unión al anticuerpo) en la proteína en cuestión, para proporcionar la unión de un anticuerpo conocido y, a menudo, de alta afinidad y permitir, de este modo, la identificación y seguimiento especiales de la proteína etiquetada que se ha añadido a un organismo vivo o a células en cultivo.

20 **[0045]** En el contexto de la presente invención, una proteína de fusión de las cadenas α y/o β del receptor de células T (TCR) «funcional» significará una proteína de fusión de las cadenas α y/o β que, aunque la cadena incluye la etiqueta epítope y/o tiene una etiqueta unida a ella, mantiene al menos una actividad biológica de proteína de 25 fusión sustancial en la fusión. En el caso de las cadenas α y/o β de un TCR, esto podría significar que ambas cadenas siguen siendo capaces de formar un receptor de células T (con las cadenas α y/o β no modificadas o con otra proteína de fusión ingeniosa de las cadenas α y/o β) que muestre su función biológica, uniéndose en particular al complejo péptido-MHC específico de dicho TCR y/o la transducción de la señal funcional tras la activación peptídica. Se prefiere una proteína de fusión de las cadenas α y/o β del receptor de células T (TCR) funcional según la presente invención en la que dicha etiqueta epítope tenga una longitud de entre 6 a 15 aminoácidos, 30 preferiblemente de 9 a 11 aminoácidos.

[0046] Incluso es más preferible una proteína de fusión de las cadenas α y/o β del receptor de células T (TCR) funcional según la presente invención, en la que dicha proteína de fusión de las cadenas α y/o β del receptor de 35 células T (TCR) comprende dos o más etiquetas epítope, espaciadas entre sí o directamente en tándem. Las realizaciones de la proteína de fusión pueden contener 2, 3, 4, 5 o incluso más etiquetas epítope, siempre que la proteína de fusión mantenga su actividad o actividades biológicas («funcional»).

[0047] Se prefiere una proteína de fusión de las cadenas α y/o β del receptor de células T (TCR) funcional según la presente invención, en el que dicha etiqueta epítope se selecciona, pero sin limitaciones, entre etiquetas 40 CD20 o Her2/neu, u otras etiquetas convencionales como myc-tag, FLAG-tag, T7-tag, HA (hemaglutinina)-tag, His-tag, S-tag, GST-tag o GFP-tag, etiquetas myc (myc-tags), T7, GST, GFP que son epítopes derivados de moléculas existentes. Por el contrario, FLAG es una etiqueta epítope sintética diseñada para obtener una alta antigenicidad (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 4.703.004 y 4.851.341). Preferiblemente puede usarse la myc-tag porque hay disponibles reactivos de alta calidad que pueden usarse para su detección. Por supuesto, las etiquetas 45 epítope pueden tener una o más funciones adicionales, más allá del reconocimiento por un anticuerpo. Las secuencias de estas etiquetas se describen en la literatura y son bien conocidas por los expertos en la materia.

[0048] En la proteína de fusión de las cadenas α y/o β del receptor de células T (TCR) funcional según la presente invención, dicha proteína de fusión puede seleccionarse, por ejemplo, a partir de dos secuencias myc-tag 50 que se unen al extremo N-terminal de una cadena α del TCR y/o 10 aminoácidos de una región lazo que sobresale del dominio constante de la cadena β que se intercambia por la secuencia de dos myc-tag.

[0049] En una realización de la presente invención los inventores insertaron una secuencia de aminoácidos que se corresponde con una parte de la proteína myc (myc-tag) en distintos sitios razonables de la estructura de un 55 receptor de células T y transdujeron este receptor modificado en células T (véanse los ejemplos a continuación). Introduciendo una etiqueta en la estructura del TCR, es posible eliminar las células modificadas administran el anticuerpo específico de la etiqueta al paciente.

[0050] Esas proteínas de fusión de TCR funcionales pueden usarse en un procedimiento de selección de una población de células huésped que expresen una proteína de fusión seleccionada entre el grupo compuesto por una proteína de fusión que comprende a) al menos una secuencia de aminoácidos que proporciona un epítoto (etiqueta epítoto) y b) la secuencia de aminoácidos de una cadena α y/o β de un TCR según se define anteriormente, en la que dicha etiqueta epítoto se selecciona entre una etiqueta epítoto añadida a los extremos N y/o C terminales de dichas cadenas α y/o β o añadida dentro de la secuencia de las cadenas α y/o β , pero fuera de la región CDR3; una etiqueta epítoto insertada en una región constante de dichas cadenas α y/o β ; una etiqueta epítoto que sustituye varios aminoácidos en una región constante de dichas cadenas α y/o β y un TCR que comprende al menos una proteína de fusión como se describe anteriormente en la superficie de la células huésped; que comprende poner en contacto las células huésped en una muestra con un agente de unión que se une inmunológicamente a la etiqueta epítoto y la selección de dichas células huésped en base a dicha unión.

[0051] La presente invención además proporciona una molécula de inmunoglobulina, anticlina, cadenas γ/δ del TCR que tiene una región CDR3 como se definió anteriormente insertada (o un derivado del mismo).

[0052] En un tercer aspecto la invención se dirige a una célula T que expresa un TCR como se define en este documento o un TCR que comprende una de las regiones CDR3 como se define anteriormente.

[0053] Además, la invención proporciona un vector, preferiblemente un plásmido, vector lanzadera, fagémido, cósmico, vector de expresión, vector retroviral, vector adenoviral o partícula y/o vector usado en terapia génica, que comprende uno o más de los ácidos nucleicos que se describe anteriormente.

[0054] En el contexto de la presente invención, un «vector» debería significar una molécula de ácido nucleico que se introduce en una célula huésped produciendo de este modo una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse dentro de una célula huésped, como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente un vector es un vector de expresión que incluye un ácido nucleico según la presente invención unido de forma operativa a las secuencias que permiten la expresión de dicho ácido nucleico.

[0055] Un cuarto aspecto proporciona una célula, preferiblemente un linfocito de sangre periférica (PBL) que se ha transformado con el vector anterior. El paso de clonación del receptor de células T (TCR) de las células T aisladas y/o que expresan los transgenes de TCR en PBMC puede darse según lo establecido en procedimientos como los descritos en Engerls y col., 2005.

[0056] En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un TCR, una célula T o una célula (PBL) como se define anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable

[0057] Los componentes activos de la presente invención se usan preferiblemente en esta composición farmacéutica, en dosis mezcladas con un vehículo aceptable o material vehículo, de modo que la enfermedad pueda tratarse o, al menos, aliviarse. Esta composición puede (además del principio activo y el vehículo) incluir material de relleno, sales, tampón, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que son conocidos en la técnica.

[0058] La expresión «farmacéuticamente aceptable» significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio activo. La elección del vehículo depende de la aplicación.

[0059] La composición farmacéutica puede contener componentes adicionales que potencien la actividad del principio activo o que suplementen el tratamiento. Estos componentes y/o factores adicionales pueden ser parte de la composición farmacéutica para conseguir efectos sinérgicos o minimizar los efectos adversos o no deseados.

[0060] Las técnicas para la formulación o preparación y aplicación/medicación de principios activos de la presente invención están publicadas en la última edición del «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Publishing Co., Easton, PA. La aplicación apropiada es una aplicación parenteral, por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intramedular, inyecciones así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intranodal, intraperitoneal o intratumoral. La inyección intravenosa es el tratamiento preferido de un paciente.

[0061] Según una realización preferida, la composición farmacéutica es una perfusión o una inyección.

[0062] Una composición inyectable es una composición líquida farmacéuticamente aceptable que comprende al menos un principio activo, p. ej., una población de células T expandida (por ejemplo, autóloga o alogénica para el paciente que se va a tratar) que expresan un TCR. El principio activo normalmente se disuelve o resuspende en un vehículo farmacéuticamente aceptable y la composición puede comprender adicionalmente cantidades menores de una o más sustancias auxiliares no tóxicas, como agente emulsionantes, conservantes y tampones, y similares. Estas composiciones inyectables que son útiles para su uso con las proteínas de fusión de esta descripción son formulaciones convencionales apropiadas bien conocidas por los expertos en la materia.

[0063] En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un procedimiento para tratar a un paciente que necesita terapia celular adoptiva, comprendiendo dicho procedimiento la administración a dicho paciente de una composición farmacéutica como se define anteriormente para dicho paciente. El paciente que se va a tratar pertenece al grupo de pacientes positivos para HLA-A2.

[0064] Preferiblemente, dicho paciente sufre una enfermedad que implica la presencia de células neoplásicas que expresan tirosinasa, preferiblemente melanoma, glioma, glioblastoma y/o tumores raros de origen ectodérmico.

[0065] Ahora, la presente invención se ilustrará mediante las figuras y ejemplos incluidos. Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no constituirán una limitación de su alcance.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0066]

Fig. 1: Selección de clones obtenidos de cultivos en dilución límite tras cebado con CD. Las células T se cebaron con células dendríticas que expresan HLA-A2 y ARN para la tirosinasa. Después de dos rondas de cebado *in vitro*, las células se clonaron mediante dilución límite. De 14 a 28 días después los clones de células T que mostraban un crecimiento adecuado en los pocillos de cultivo individuales se identificaron mediante microscopía óptica. Se obtuvieron alicuotas de los clones en crecimiento y se probaron en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr para medir su actividad citotóxica frente a dos líneas celulares diana de melanoma. Las células Mel-A375 expresan HLA-A2 pero no tirosinasa. Las células Mel-93.04A12 expresan HLA-A2 y tirosinasa, por lo que pueden formar los ligandos reconocidos por células T específicas del péptido de la tirosinasa restringidas por HLA-A2. Si los clones de células T reconocen las células Mel-A375, esto significa que los clones están alorrestringidos y reconocen HLA-A2 independiente del péptido de la tirosinasa (es decir, clones T41 y T42). Si los clones de células T sólo reconocen Mel-93.04A12, entonces deberían tener especificidad por ligandos del péptido de la tirosinasa restringido por HLA-A2 (es decir, T58; T43). Se proporciona el porcentaje específico de lisis mediada por diversos clones de células T (enumerados en el eje x) para las dos líneas celulares de melanoma diana. La flecha indica el clon T58 que muestra fuerte actividad citotóxica sobre Mel-93.04A12 pero no sobre Mel-A375. Este clon se seleccionó para una caracterización adicional en base a su gran capacidad de crecimiento.

Fig. 2: Comparación de los clones T58 y IVS-B

Fig. 2a: Actividad citotóxica dirigida frente a líneas celulares de melanoma. La capacidad citotóxica del clon T58 se comparó con la del clon IVS-B, derivado de un paciente con melanoma, usando como células diana la línea celular T2 pulsada con un péptido de la tirosinasa sintético para la secuencia de aminoácidos YMDGTMSQV a diferentes concentraciones molares, enumeradas en el eje x. El % de lisis relativa se proporciona en el eje y. La concentración de péptido que se corresponde con una lisis relativa del 50 % se indica mediante líneas cruzadas y muestra que el clon T58 puede reconocer concentraciones sustancialmente menores de péptido en comparación con el clon IVS-B.

Fig. 2b: Determinación de unión al multímero y tasas de unión. Los dos clones se incubaron con multímeros para determinar el porcentaje de células positivas a tiempo 0 h. Ambos clones se unen al multímero en el 100 % de las células. El multímero se eliminó mediante lavado y los clones se incubaron en medio que contenía anticuerpos específicos de HLA-A2. Cuando los multímeros se liberan de la superficie celular, son capturados por el anticuerpo y no pueden unirse de nuevo a las células. El porcentaje de células positivas para el multímero se analiza de nuevo tras 1 h y 2 h.

Fig. 2c: Secreción de interferón gamma tras la estimulación con líneas celulares de melanoma. Los clones T58 e IVS-B se cultivaron conjuntamente con las dos líneas celulares de melanoma usadas para la selección inicial (descritas en la figura 1) y su secreción de IFN- γ al medio de cultivo se evaluaron mediante ELISA estándar después de 24 horas. n. d. = no detectable. Los datos se presentan como pg/ml en el eje y.

Fig. 2d: Actividad citotóxica frente a líneas celulares de melanoma. Se comparó la actividad citotóxica de los clones usando un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr como se describe en la figura 1. Los datos se proporcionan como porcentaje de lisis específica en el eje y.

10

Fig. 3: Reconocimiento de las células tumorales del melanoma primario por los clones T58 e IVS-B (a) expresión superficial de HLA-A2 en las células del tumor primario (12 subcultivos) de un paciente con melanoma HLA-A2 transfectado con 50 μg de ARN t iv de HLA-A2 y en las líneas celulares de melanoma establecidas Mel-93.04A12 (HLA-A2 $^+$ tirosinasa $^+$) y Mel-A375 (HLA-A2 $^+$ tirosinasa) se midió mediante citometría de flujo tras la tinción con anticuerpo monoclonal específico de HLA-A2. En cada histograma se presenta la muestra teñida (curvas rellenas) y la muestra control correspondiente (curvas vacías): las curvas control representan células del tumor primario no transfectadas teñidas con un anticuerpo monoclonal específico para HLA-A2 (histograma izquierdo) o líneas celulares de melanoma teñidas con anticuerpo control antiisotipo. La expresión de la proteína HLA-A2 en las células del tumor primario transfectadas con ARN se detectó 10 h después de la electroporación. (b) La capacidad del clon de células T derivado del paciente (IVS-B) y del clon de células T T58 para secretar IFN- γ o (c) liberación de perforina en cultivo conjunto con las células de melanoma mostradas anteriormente se midieron en ensayos ELISPOT.

15

20

Fig. 4: Transferencia de especificidad de antígeno mediante transferencia retroviral de genes de TCR. (a) La línea de células T deficiente en TCR humana Jurkat76 9 se transdujo con el TCR del clon de células T T58. La expresión de TCR se detectó usando multímeros de HLA específicos del péptido de la tirosinasa. La expresión de TCR sólo se detectó en células Jurkat 76 transducidas con TCR-T58 (histograma derecho) y no en células Jurkat76 no transducidas (histograma izquierdo). (b) Los PBL de un donante sano se transdujeron mediante retrovirus con TCR-T58. Después de 10 días, se analizó la expresión de TCR para la tirosinasa en los PBL transducidos y no transducidos con TCR usando multímeros de HLA específicos. Se muestra la tinción del multímero en el eje x y la tinción CD8 en el eje y. El porcentaje de células T multímero $^+$ CD8 $^+$ se muestra en el cuadrante superior derecho. (c) La funcionalidad de los PBL transducidos por TCR se midió usando un ensayo estándar de liberación de IFN- γ . Las células T2 con cantidades graduales de péptido de la tirosinasa $_{369-377}$ (10^{-12} M – 10^{-5} M) se usaron como células diana a una relación fija 1: 1 ente el efector y las células diana. Los PBL no transducidos sirvieron como control y no mostraron liberación de IFN- γ específico del péptido de la tirosinasa (datos no mostrados). Los datos se muestran como pg/ml de citoquina tras restar la secreción de controles de PBL no transducidos. (d) La capacidad de secretar IFN- γ en cultivo conjunto con las líneas celulares de melanoma SK-Mel-28 (HLA-A-tirosinasa $^+$), Mel-A375 (HLA-A2+tirosinasa $^-$), Mel-624.38 (HLA-A2+tirosinasa $^+$) y Mel-93.04A12 (HLA-A2+tirosinasa $^+$) se evaluó usando un ensayo convencional de liberación de IFN- γ usando una relación E: T = 1.1, (n.d = no detectable).

35

40

Fig. 5: Transferencia de especificidad de T58 e IVS-B para HLA-A2 y el péptido de la tirosinasa YMDGTMSQV mediante transferencia del gen retroviral TCR. (a) Los PBL de un donante sano se transdujeron mediante retrovirus con el TCR-IVS-B derivado del paciente o el TCRT58. Después de 11 días, se analizó la expresión de TCR para la tirosinasa en los PBL no transducidos y transducidos con TCR usando multímeros de HLA específicos. Se muestra la tinción del multímero en el eje x y la tinción CD8 en el eje y. El porcentaje de células T multímero $^+$ CD8 $^+$ se muestra en el cuadrante superior derecho. (b) La funcionalidad de los PBL transducidos con TCR se midió usando un ensayo estándar de liberación de IFN- γ . Las células T2 cargadas con cantidades graduales del péptido de la tirosinasa $_{369-377}$ (10^{-11} M – 10^{-5} M) o con 10^{-5} M de proteína $_{58-66}$ de la matriz del virus de la gripe no relacionado se usaron como células diana a una relación fija 1: 1 entre el efector y la célula diana. Los PBL no transducidos sirvieron como control y no mostraban liberación de IFN- γ específico del péptido de la tirosinasa (datos no mostrados). Los datos se muestran con pg/ml de citoquina tras restar la secreción de los controles de PBL no transducidos (media = 219 – 368 pg/ml) y se ajustó para valores comparables de células multímero $^+$.

45

50

Fig. 6: Reconocimiento de CTL específico del péptido de la tirosinasa de líneas celulares tumorales y células tumorales de melanoma primario. En las columnas se representa la cantidad de INF- γ (pg/ml) secretada por CTL D115 autorrestringidos y CTL T58 alorrestringidos con un panel de líneas celulares tumorales, de izquierda a derecha: MaCal (HLA-A2 $^-$ tirosinasa $^-$); SK-Mel-28 (HLA-A2 $^-$ tirosinasa $^+$); Mel-A375, RCC-26, PancTu 1, MaCa1/A2 y UTS CC 1588 (todas HLA-A2 $^+$ tirosinasa $^-$); Mel-624.38, Mel-93.04A12, SK-Mel-23, SK-Mel-29 y WM-266-4 (todas

55

HLA-A2⁺tirosinasa⁺). Células T indica CTL sin células estimulantes. Las líneas celulares tumorales HLA-A2⁺tirosinasa- Mel-A375, RCC-26 y MaCa1/A2 se cargará de forma exógena con 10⁻⁵ M de péptido de la gripe no relacionado o con 10⁻⁵ M de péptido YMD de la tirosinasa y se midió la secreción de IFN-γ mediante ELISA cuyos resultados se proporcionan como pg/ml.

5

Fig. 7: Transferencia de especificidad de antígeno mediante transferencia retroviral de TCR-D115 y TCR-T58. Se transdujeron PBL de un donante sano con TCR-D115 o TCR-T58. La especificidad de reconocimiento se evaluó mediante la liberación de IFN-γ seguido de cultivo conjunto con líneas celulares tumorales, de izquierda a derecha:

MaCa1 (HLA-A2⁻tirosinasa⁻); SK-Mel-28 (HLA-A2⁻tirosinasa⁺); Mel-A375, RCC-26, PancTu 1, MaCa1/A2 y UTS CC

10 1588 (todas HLA-A2⁺tirosinasa⁻); Mel-624.38, Mel-93.04A12, SK-Mel-23, SK-Mel-29 y WM-266-4 (todas HLA-A2⁺tirosinasa⁺). Células T indica CTL sin células estimulantes. Las líneas celulares tumorales HLA-A2⁺tirosinasa⁻ Mel-A375, RCC-26 y MaCa1/A2 se cargaron de forma exógena con 10⁻⁵ M de péptido de la gripe no relacionado o con 10⁻⁵ M de péptido YMD de la tirosinasa y se midió la secreción de IFN-γ mediante ELISA que se proporciona como pg/ml.

15

Fig. 8: Transferencia de especificidad de antígeno mediante transferencia retroviral de TCR-D115 y TCR-T58. (A) Se transdujeron PBL de un donante sano con TCR-D115 o TCR-T58. El día 10 se analizó la capacidad de los PBL transducidos con TCR no clasificados para expresar TCR usando multímeros B7-pp65 y A2-pp65 no relacionados y multímero A2-tyr específicos. Los PBL no transducidos no mostraron unión al multímero (0,1 %, datos no mostrados). Los porcentajes de células T multímero⁺CD8⁺ se muestran en el cuadrante superior derecho. (B) y (C) muestran la liberación de IFN-γ de PBL transducidos con TCR no clasificados tras la estimulación con células T2 cargada con cantidades graduales de péptido de la tirosinasa (10⁻¹² M – 10⁻⁵ M) en una relación de 2: 1. En (B) la liberación de IFN-γ relativa se muestra en porcentajes y en (C) la liberación de IFN-γ específica se presenta como pg/ml. (D) La funcionalidad de los PBL transducidos con TCR no clasificados se midió mediante la liberación de IFN-

20 y usando PBMC HLA-A2⁺ autólogos cargados con el péptido de la tirosinasa (10⁻¹¹ M - 10⁻⁶ M) como células estimulantes en relación 2:1. Los PBL no transducidos (▲) no mostraban liberación de IFN-γ específica de péptido. (E) Las líneas celulares tumorales HLA-A2⁺tirosinasa⁻ Mel-A375, RCC-26 y MaCa1/A2 se cargarán de forma exógena con 10⁻⁵ M de péptido de la gripe no relacionado (f) o 10⁻⁵ M de péptido YMD de la tirosinasa (t) y se midió la secreción de IFN-γ mediante ELISA cuyos resultados se proporcionan en pg/ml. (F) La especificidad de reconocimiento se evaluó mediante la liberación de IFN-γ seguido de cultivo conjunto con las líneas celulares tumorales, de derecha a izquierda: MaCa1 (HLA-A2⁻tirosinasa⁻); SK-Mel-28 (HLA-A2⁻tirosinasa⁺); Mel-A375, RCC-26, PancTu 1, MaCa1/A2 y UTS CC 1588 (todas HLA-A2⁺tirosinasa⁻); Mel-624.38, Mel-93.04A12, SK-Mel-23, SK-Mel-29 y WM-266-4 (todas HLA-A2⁺tirosinasa⁺). Células T indica CTL sin células estimulantes.

35 Fig. 9: La transferencia de TCR mantiene las diferencias en el perfil de citoquinas. (A-D) A la izquierda se muestra la liberación de citoquinas de los PBL transducidos con TCR en cultivo conjunto con las líneas de melanoma Mel-A375 (HLA-A2⁺tirosinasa⁻) y Mel-624.38 (HLA-A2⁺tirosinasa⁺), a la derecha se muestra la liberación de la citoquina correspondiente tras la estimulación con células T2 cargadas con cantidades graduales de péptido de la tirosinasa (10⁻¹² M - 10⁻⁵ M). Los PBL no transducidos (▲) no muestran liberación de citoquina específica del péptido. Se midieron las siguientes citoquinas: IFN-γ (A), IL-2 (B), TNF-α (C) y MIP-1β (D). Los niveles de secreción de citoquinas para estas cuatro citoquinas eran mayores cuando se usaban PBL transducidos con el TCR-T58 alorrestingido. Puesto que los PBL no transducidos secretaban niveles muy altos de MIP-1β en respuesta a las células T2, es posible que no pueda evaluarse el valor del péptido para esta citoquina.

45 EJEMPLO I

[0067] Los inventores prepararon la estimulación de células dendríticas (CD) a partir de un donante sano negativo para HLA-A2 que expresaba conjuntamente moléculas de HLA-A*0201 alogénicas y la proteína tirosinasa usando CD maduras que se electroporaron con ARNtv que transcribe la tirosinasa *in vitro* y HLA-A2, como se ha descrito^{1,2}. Estas CD se usaron para cebar células T CD8⁺ autólogas purificadas usando dos rondas de estimulación con CD recién preparadas. Tras estas dos rondas de cebado, las células T CD8⁺ con receptores de células T (TCR) que reconocían complejos peptídicos HLA-A2-tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ se tiñeron usando una molécula tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇/HLA-A*0201-multímero³. Las células CD8⁺multímero⁺ se aislaron mediante clasificación de células activada por fluorescencia. Las células clasificadas se clonaron en cultivos a dilución límite y los clones aislados que mostraban especificidad HLA-A2/péptido de la tirosinasa se expandieron usando estimulación independiente de antígeno⁴. El clon T58 de células T se identificó en una selección inicial ya que tenía una buena actividad funcional (figura 1).

55

[0068] Debido a que T58 se aisló a partir de un donante negativo para HLA-A*0201, este representa un clon de células T alorrestingido que no sufrió selección negativa *in vivo*. La actividad del clon T58 se comparó con el clon IVS-B que se aisló a partir de un paciente con melanoma metastásico⁵. Este clon reconoce exactamente el mismo ligando HLA-A2/péptido de la tirosinasa que el clon T58 pero está autorrestingido, ya que estaba activado *in vivo* en el paciente que era positivo para HLA-A*0201. Este clon de células T derivado del paciente representa un ejemplo de células T que está disponible en el repertorio periférico sometido a selección negativa frente a péptidos/moléculas de MHC propias en el timo *in vivo*.

[0069] Se realizaron comparaciones en paralelo de los clones T58 e IVS-B para demostrar las propiedades superiores del clon T58 alorrestingido frente al clon IVS-B autorrestingido. Se determinó la avidéz de la célula T funcional por el péptido de la tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr usando células HLA-A2⁺T2 pulsadas con cantidades graduales de péptido exógeno cómo células diana. La concentración de péptido necesaria para obtener el 50 % de lisis relativa definía el valor de la lisis semimáxima⁶. El clon T alorrestingido T58 requería sustancialmente menos péptido para ser activado por las células T2 pulsadas con péptido que el clon IVS-B (6,0x10⁻¹⁰ M frente a 3,0x10⁻⁸ M) (Fig. 2a).

[0070] Como una estimación de la afinidad de unión estructural de TCR-MHC/péptido, se midió la pérdida de multímero a lo largo del tiempo (es decir, la velocidad de interacción HLA-multímero). Una velocidad de interacción más lenta indica que las interacciones TCR-ligando son más estables y de mayor afinidad estructural⁷. Tras la incubación inicial con el multímero y el lavado, las células T se incubaron durante 1 y 2 h sin multímero en presencia de anticuerpo específico de HLA-A2 para prevenir la reasociación celular de los multímeros liberados. El clon de células T derivado de un paciente con melanoma IVS-B mostraba una unión al multímero intermedia: todas las células era multímero⁺ a las 0 h y aproximadamente el 40 % permanecían con multímeros a 1 y 2 h (fig. 2b). Por el contrario, el clon T58 tenía una velocidad de interacción más lenta, mostrando una unión positiva del 75 % a 1 h frente al 41 % para el clon IVS-B e incluso a las 2 h seguía habiendo algunas células multímero⁺ más (55 % frente al 40 %).

[0071] Se analizaron ambos clones de células T en un ensayo de liberación de IFN-γ en cuanto a su función y especificidad (fig. 2c). Los clones se cultivaron conjuntamente con dos líneas celulares de melanoma que expresaban moléculas de HLA-A2 pero diferían con respecto a la expresión de la proteína tirosinasa: Mel-93.04A12 expresa conjuntamente ambas proteínas (HLA-A2⁺tirosinasa⁺) pero Mel-A375 no expresa la proteína tirosinasa (HLA-A2⁺tirosinasa⁻) y, por tanto, no puede genera el ligando del péptido MHC visto por los clones de células T. El clon T58 de células T alorrestingido era inducido a secretar un alto nivel de IFN-γ por la línea celular que expresaba la tirosinasa, mientras que solo se observó secreción marginal de citoquinas en las células IVS-B (1,234 pg/ml frente a 106 pg/ml), lo que demuestra la función enormemente superior del clon T58 en el reconocimiento de las células tumorales que expresar su ligando HLA-A2-tirosinasa. Como era de esperar, los clones no mostraron una secreción de IFN-γ detectable tras la estimulación con las células Mel-A375, lo que demuestra la especificidad por HLA-A2 y la expresión de la tirosinasa para el reconocimiento de las células tumorales.

[0072] La capacidad citotóxica del clon T58 alorrestingido también se comparó con la del clon IVS-B usando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (fig. 2d). De nuevo, el clon T58 mostraba una función superior (76 % de lisis específica frente al 24 %).

[0073] También se probó la capacidad de ambos clones para reconocer las células del melanoma primario. Puesto que no se disponían de células primarias de melanoma HLA-A2⁺, se introdujo ARN_{tiv} para HLA-A2 en las células tumorales al igual que en las CD (fig. 3a). La función se midió usando ensayos ELISPOT para la detección de la secreción de IFN-γ y perforina para evitar la liberación espontánea elevada de marcaje radiactivo por las células del tumor primario. Se demostró que el reconocimiento de las células del tumor primario estaba restringido por HLA-A2 ya que no se reconocían las células del tumor primario que carecían de ARN para HLA-A2. Una vez más, se observó una fuerte diferencia con mal reconocimiento por las células IVS-B autorrestingidas del paciente frente a un buen reconocimiento por las células T58 alorrestingidas según se evaluó con la secreción de IFN-γ (fig. 3b) y mediante la secreción de perforina (fig. 3c).

[0074] Para demostrar que la avidéz funcional superior de las células T58 alorrestingidas residía directamente en el TCR, se generaron retrovirus recombinantes independientes para las cadenas alfa y beta del TCR del clon T58 como se ha descrito⁸. Las células Jurkat76 deficientes en TCR humanas se infectaron conjuntamente con los retrovirus de las cadenas α y β y la expresión del TCR transgénico se determinó mediante

tinción del multímero⁹. TCR-T58 se expresó a buen nivel, lo que demuestra una calidad adecuada de los sobrenadantes retrovirales independientes (fig. 4a). A continuación, los linfocitos de sangre periférica (PBL) activados de un donante sano HLA-A2 se transdujeron y analizaron con multímeros para la expresión de PCR específico de la tirosinasa (fig. 4b). A pesar de su baja frecuencia, los PBL transducidos con TCR-T58 liberaban grandes cantidades de IFN- γ tras la estimulación con células T2 con cantidades graduales de péptido de la tirosinasa (fig. 4c). Los PBL transducidos con TCR-T58 también podían responder específicamente a la estimulación con líneas celulares de melanoma que expresaban HLA-A2 y tirosinasa (fig. 4d). Estas células no respondía a las células tumorales que no expresaban HLA-A2 o tirosinasa, lo que demostraba de nuevo la especificidad de los ligandos de HLA-A2-tirosinasa para el reconocimiento de T58.

10

[0075] También se prepararon vectores retrovirales bicistrónicos que codificaban las cadenas α y β del TCR de las células IVS-B y se usaron para transducir PBL activados. En paralelo, los mismos PBL activados se transdujeron con vectores retrovirales bicistrónicos que codificaban las dos cadenas de TCR-T58. Los PBL que expresaban los correspondientes vectores se identificaron mediante tinción conjunta para CD8 y multímero y mostraron bajas cantidades de células positivas. (fig 5a). A pesar de su baja frecuencia, los PBL transducidos con TCR-T58 liberaban grandes cantidades de IFN- γ tras la estimulación con células T2 pulsadas con cantidades graduales de péptido de la tirosinasa. Los PBL que expresaba TCR-IVS-B secretaban de lejos menos IFN- γ . No se detectó secreción de citoquina específico del péptido de la tirosinasa con las células PBL control no transducidas. Los datos se muestran como pg/ml de citoquina tras restar la secreción de los controles de PBL no transducidos (media = 318, intervalo = 219 – 369 pg/ml) (fig. 5b).

[0076] En la tabla 1 se muestra la información genética correspondiente al uso de segmentos de los genes VJ y VDJ por las cadenas alfa y beta de TCR-T58, respectivamente. Las regiones CDR3, según los datos IMGT, se presentan como secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos. También se muestran las secuencias optimizadas de los codones de las regiones VJ y VDJ completas.

Materiales y procedimientos

Líneas celulares

30

[0077] Las líneas celulares de melanoma humanas, Mel-A375 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁻; CRL-1619, American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, MD), Mel-93.04A12 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁺, cedida por P. Schrier, Department of Immunohematology, Leiden University Hospital, Países Bajos), Mel-624.3810 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁺, cedida por M. C. Panelli, National Institutes of Health, Bethesda, MD), SK-Mel-28 (HLA-A2⁻, tirosinasa⁺; MTB-72, ATCC) así como la línea celular linfocite T2 (CRL-1992, ATCC) y la línea celular humana de células T deficiente en TCR Jurkat76⁹ se cultivaron en medio RPMI 1640 con suero fetal de ternera (SFT) al 12 %, L-glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM y aminoácidos no esenciales.

[0078] El clon de células T IVS-B derivado de un paciente con melanoma específico del péptido de la tirosina₃₆₉₋₃₇₇ restringido para HLA-A*0201 se cultivó como se ha descrito⁵.

Producción de ARNtiv de tirosinasa y HLA-A2

[0079] El plásmido pCDMB-HLA-A2 con ADNc de HLA-A*0201 y el pZeoSV2+/huTyr con ADNc de la tirosinasa se linealizaron y usaron como moldes de transcripción *in vitro* para producir ARN con la ayuda del kit mMMESSAGE mMACHINE T7 (Ambion, Austin, TX) según las instrucciones del fabricante.

Cebado de novo de células T con CD pulsadas con ARN

[0080] Se recogieron muestras de sangre de donantes sanos tras obtener el consentimiento informado y con la aprobación del comité de revisión institucional del Hospital Universitario de la Universidad Ludwig-Maximilians, Munich, Alemania. Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Los PBL se resuspendieron en 15 ml de medio RPMI 1640 con muy bajo contenido en endotoxina (VLE) (Biochrom, Berlín, Alemania) suplementado con suero humano al 1,5 % (medio CD) a $7,5 \times 10^7$ células por frasco de cultivo de 75 cm² y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 1 h. Las células no adheridas se eliminaron cuidadosamente mediante lavado. Las CD maduras se prepararon a partir de monocitos adheridos y se transfectaron con ARNtiv mediante electroporación como se describe previamente². Las CD de donantes HLA-A2⁻ se transfectaron conjuntamente con 24 μ g de ARNtiv de tirosinasa y 48 μ g de ARNtiv de HLA-A2. El mismo día, se llevó

a cabo un enriquecimiento en linfocitos T CD8⁺ autólogos a partir de PBL mediante selección negativa usando un kit comercial según las instrucciones del fabricante (kit II de aislamiento de células T CD8⁺ (humano), Miltenyi, Bergisch, Gladbach, Alemania). Los cultivos conjuntos se iniciaron 10 h desde de la electroporación de CD en placas de 24 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza) añadiendo 1x10⁵ CD pulsadas con ARN a 1x10⁶ células T CD8⁺ en medio RPMI 1640, suplementado con suero humano inactivado por calor al 10 %, L-glutamina 4 mM, HEPES 12,5 mM, β-mercaptoetanol 50 μM y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (medio de células T). Se añadió IL-7 (5 mg/ml) (Promokine, Heidelberg, Alemania) a día 0 y se añadieron 50 U/ml de IL-2 (Chiron Behring, Marburgo, Alemania) después de 2 días y, a continuación cada 3 días. La adición de IL-2 se retrasó para disminuir la proliferación de células T CD8⁺ no específicas. La segunda estimulación de células T cebadas se hizo después de siete días usando CD pulsadas con ARN recién preparadas.

Tinción y clasificación de multímeros de HLA

[0081] Siete días después de la segunda estimulación de las células T enriquecidas en CD8 con CD pulsadas con ARN, las células T específicas de tirosinasa restringidas para HLA-A2 se detectaron mediante tinción con un anticuerpo anti-CD8-APC HLA-A*0201/péptido htyr₃₆₉₋₃₇₇ /multímero¹¹ β₂m humano (clon RPA-T8, BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) y yoduro de propidio (IP: 2 μg/ml). Para la clasificación, se incubaron hasta 5x10⁶ células con 12 μg de multímero en 100 μl de PBS + suero humano al 0,5 %. A continuación se añadió anticuerpo CD8-APC a 1/50 durante 25 min más. Tras la tinción, las células se lavaron dos veces y se diluyeron en PBS + suero humano al 0,5 % con IP para la clasificación. Para dicha clasificación se tiñeron 20 – 50x10⁶ células totales por cultivo cebado. Las células IP negativas se separaron y las células CD8⁺multímero⁺ se clasificaron en un clasificador de células FACSARIA (BD Biosciences) con una boquilla de 70 μm, a una velocidad de 15.000 eventos/s.

[0082] En los ensayos de velocidad de interacción HLA-multímero, las células se lavaron tras la unión al multímero y se resuspendieron en tampón de FACS que contenía cantidades saturantes de anticuerpo monoclonal BB7.2 (ATCC) para capturar los multímeros despegados y prevenir la unión de nuevo a las células T. Después de 1 o 2 h, las muestras se fijaron en tampón de FACS con paraformaldehído al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo⁷.

30 Cultivo de clones T específicos de péptido

[0083] Las células T clasificadas por multímero se clonaron mediante dilución límite. Los clones se dispusieron en placas de 96 pocillos de fondo redondo (TPP) en 200 μl/pocillo de medio de células T. Se añadieron 50 U/ml de IL-2 cada 3 días con 5 ng/ml de IL-7 y 10 ng/ml de IL-15 (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) cada 7 días. Los clones de células T se estimularon de forma no específica con un anticuerpo anti-CD3 (0,1 μg/ml; OKT-3) y se suministraron 1x10⁵ células nodrizas por placa de 96 pocillos, que consistían en PBL irradiados (50 Gy) derivados de una mezcla de cinco donantes no relacionados y 1x10⁴ B-LCL alogénicas transformadas con EBV (150 Gy) irradiados cada dos semanas. Las células T en proliferación se transfirieron a placas de 24 pocillos (TPP) y se cultivaron en 1,5 ml de medio de células T más citoquinas. Se añadieron 1x10⁶ PBL alogénicos irradiados y 1x10⁵ B-LCL alogénicos transformados con EBV irradiados por pocillo como células nodrizas en placas de 24 pocillos. La capacidad de clonación se determinó mediante análisis de la cadena beta del receptor TCR como se ha descrito¹².

Carga del péptido de células T2

[0084] Para pulsar el péptido exógeno, se incubaron 1x10⁶ células T2 a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 2 h con 10 μg/ml de macroglobulina β₂ humana (Calbiochem, San Diego, CA) y cantidades de valoración que oscilaban de 10⁻⁵ M a 10⁻¹² M del péptido de la tirosinasa YMD (tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ YMDGTMSQV, Metabion, Martinsried, Alemania). Las células T2 pulsadas con 10⁻⁵ M de péptido GIL de la gripe (proteína de matriz de la gripe₅₈₋₆₆ GILGFVTL, Metabion) sirvieron como control negativo. Tras el lavado, las células T2 cargadas con el péptido se usaron como células diana en ensayos de citotoxicidad o de liberación de INF-γ.

Ensayo de liberación de IFN-γ

[0085] Para estudiar su especificidad, los clones de células T (2x10³ células en 100 μl) se incubaron con las líneas celulares de melanoma respectivas o con células T2 pulsadas con péptido (1x10⁴ células en 100 μl). Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron después de 24 horas de cultivo conjunto y se ensayaron mediante un ELISA estándar usando el set de IFN-γ humano OptEIATM (BD Biosciences Pharmingen).

Ensayo de citotoxicidad

[0086] La actividad citotóxica de los clones de células T se analizó en un ensayo estándar de liberación de cromo 51 de 4 horas de duración. Se usaron como células diana células de melanoma o células T2 cargadas con el péptido. Brevemente, se marcaron 1×10^6 células diana con $100 \mu\text{Ci}$ de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (ICN Biochemicals, Irvine, CA) durante 1 – 1,5 h. Las células diana marcadas con ^{51}Cr se cultivaron con células T en $100 \mu\text{l}$ /pocillo de RPMI 1640 con SFT al 12 % en placas de cultivo para tejidos de 96 pocillos de fondo en V (Greiner, Solingen, Alemania). Para la determinación de la avidéz funcional se añadieron 1×10^4 células T a 1×10^3 células T2 pulsadas con péptido cargadas con cantidades de valoración de péptido, según una relación E: T constante de 10: 1.

10

[0087] Después de 4 h de cultivo conjunto a 37°C , se recogieron $50 \mu\text{l}$ del sobrenadante y se determinó la radioactividad en un contador gamma. El porcentaje de lisis específico se calculó como: $100 \times (\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$. La liberación espontánea se evaluó mediante incubación de las células diana en ausencia de células efectoras y, en general, fue menor del 15 %. Para el cálculo del porcentaje de lisis relativa, el porcentaje máximo de lisis específica se estableció como valor de referencia del 100 % y se calcularon los valores correspondientes a esta referencia. Para determinar la lisis media máxima, se representó el porcentaje de lisis relativa frente a la concentración de péptido. La concentración de péptido a la cual la curva cruzada el 50 % de lisis relativa se tomó como el valor de lisis media máxima.

20 ELISPOT

[0088] Placas de PVDF previamente recubiertas con anticuerpo (Mabtech AB, Nacka, Suecia) se incubaron a 37°C en medio de CTL Test™ (Cellular Technology Ltd., Cleveland, Ohio) durante 2 h para bloquear la unión inespecífica. Para el ELISPOT de IFN- γ , las placas se cubrieron previamente con el anticuerpo de captura del clon 1-D1K específico de IFN- γ ; para el ELISPOT de perforina las placas se cubrieron previamente con anticuerpo de captura específico de perforina (clon Pf-80/164; Mabtech, AB). Las células T cebadas se lavaron con medio de cultivo de CTL suplementado Wath™ (Cellular Technology Ltd) y 1×10^3 células T respondedoras se estimularon con 5×10^4 células de melanoma en $150 \mu\text{l}$ de medio de CTL Test™ y 24 h después se ensayaron en ELISPOT específico para IFN- γ o 48 h después en ELISPOT específico para perforina. Después de lavar con PBS/Tween al 0,01 % y PBS solo, las placas se incubaron con un anticuerpo de detección directo conjugado con estreptavidina-fosfatasa alcalina (FP) (clon 7-B6-1; Mabtech AB) en el caso del ELISPOT de IFN- γ o con un anticuerpo de detección biotinilado (clon Pf-344; Mabtech AB) en el caso del ELISPOT para perforina durante 2 h a temperatura ambiente seguido de 1 h de incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina (FA). Las placas se lavaron de nuevo y se añadió una solución de sustrato BCIP/NBT-plus lista para su uso (Mabtech AB). Las manchas se contaron usando el sistema lector AID ELR03 con la versión 4.0 del software (AID Autoimmun Diagnostika GMBH, Strassberg, Alemania).

Construcción de vectores retrovirales, producción de sobrenadantes de virus y transducción de células Jurkat76T y de PBL

40

[0089] Para la identificación de TCR de clones de células T específicos del tumor, se amplificaron mediante PCR parte de las secuencias de las cadenas TCR α y TCR β que incluían la región determinante de complementariedad (CDR3) usando un panel de cebadores de TCRV α y TCRV β combinados con el respectivo cebador de la región constante¹³. Los genes de las cadenas TCR α y TCR β de los clones de células T T58 y IVS-B se amplificaron mediante PCR con cebadores específicos de gen y se clonaron en el vector retroviral MP71PRE⁸ a través de sitios de restricción para NotI y EcoRI. Ambas cadenas de los TCR-T58 (V α 7, V β 23) y TCR-IVS-B (V α 3, V β 14) humanos se construyeron como vectores génicos de TCR-sencillo o vectores génicos de TCR dobles (pMP71-T58 α y pMP71-T58 β , pMP71-IVS-B α y pMP71-IVS-B β (3); pMP71-T58 β -P2A-T58 α y pMP71-IVS-B β -P2A-IVS-B α). Los plásmidos vectores retrovirales se transfectaron conjuntamente en células 293T con plásmidos de expresión que codificaban los genes MLV gag/pol y MLV-10A1 env del virus de la leucemia de Moloney para producir retrovirus anfortróficos MLV pseudotipados, como se ha descrito¹⁴. La línea celular T deficiente en TCR humana Jurkat76 y los PBL se tradujeron como se ha notificado¹⁴. Las células Jurkat76 (5 días tras las transducción) y los PBL (10 días después de la transducción) se tiñeron usando múltímero del péptido HLA-A*0201/htyr₃₆₉₋₃₇₇/ $\beta_2\text{m}$ humano marcado con PE y anticuerpo anti-CD8-FITC. A día 13 se realizó una prueba de liberación de INF- γ usando células T2 cargadas con cantidades graduales del péptido de la tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ (10^{-12} M – 10^{-5} M) o células T2 pulsadas con 10^{-5} M de péptido de proteína de la matriz₅₈₋₆₆ del virus de la gripe y las líneas celulares tumorales SK-Mel-28, Mel-A375, Mel-624.38 y Mel-93.04A12 como células estimulantes en una relación E: T = 1: 1. Los valores control para PBL sin transducir estimulados con péptido se restaron de los valores de las células transducidas a cada concentración peptídica y, a continuación, se ajustaron a valores comparables de las células transgénicas TCR.

Análisis de T58-TCR

[0090] Para el análisis del receptor de células T del clon T58 específico de la tirosinasa, se amplificó parte de las cadenas alfa y beta de TCR que contenían la región CDR3 mediante RT-PCR usando un panel de cebadores TCR V α y TCR V β combinados con un cebador respectivo de la región constante de TCR. Los productos se secuenciaron y asignaron según los datos IMGT (Tabla 1; IMGT, El sistema de información internacional ImMunoGeneTics[®], <http://imgt.cines.fr>).

10 Modificaciones de la secuencia de TCR

[0091] La optimización de codones de la regiones VJ/VDJ de ambas cadenas T58-TCR se realizó para facilitar la traducción del ARNm del TCR (tabla 1). Las etiquetas de anticuerpo, por ejemplo las myc-tags¹⁵ (número de solicitud de patente: 06014606.5-1212) u otras modificaciones, por ejemplo un epítotope C20, pueden introducirse en cualquier posición, es decir, el extremo N-terminal de la cadena TCR α , que es reconocido por el anticuerpo de depleción y no interfiere con la funcionalidad del TCR.

ES 2 394 180 T3

Tabla 1: secuencias de TCR-CD3 y regiones VJ/VDJ con codones optimizados del clon T58

	Cadena alfa
Región VJ*	TRAV1-2 AJ28
Región CD3*	
Secuencia de nucleótidos	TGTGCTGTGACATACTCTGGGGCTGGGAGTTACCAACT
Secuencia de aminoácidos	C (SEQ ID NO: 3)
	G A V T Y S G A G S Y Q L (SEC ID N.º 5)
VJ con codones optimizados	ATGTGGGGCGTGTCTGCTGTACGTGTCCATGAAGAT GGGCGGCACCACCGGCCAGAACATCGACCAGCCCACC GAGATGACAGCCACCGAGGGCGCCATCGTGCAGATCA ACTGCACCTACCAGACCAGCGGCTTCAACGGCCTGTTC TGGTATCAGCAGCACGCCGGCGAGGCCCTACCTTCT GAGCTACAACGTGCTGGACGGCCTGGAAGAGAAGGGC CGGTTACAGCAGCTTCTGAGCCGGTCCAAGGGCTACAG CTACCTGCTGCTGAAAGAACTGCAGATGAAGGACAGC GCCAGCTACCTGTGCGCCGTGACCTACAGCGGAGCCG GCAGCTACCAGCTGACCTTCGGCAAGGGCACCAAGCT GTCCGTG (SEQ ID NO: 7)
	Cadena beta
Región VDJ*	TRBV 13 BD1 BJ1-4
Región CDR3*	
Secuencia de nucleótidos	TGTGCCAGCAGTCAGAAACAGGGCTGGGAAAACTG
Secuencia de aminoácidos	(SEQ ID NO: 4)
	G A S S Q K Q G W E K L (SEC ID N.º 6)
	Cadena beta
VDJ con codones optimizados	ATGCTGTCCCCCGATCTGCCCGACAGCGCCTGGAACAC CAGACTGCTGTGCCACGTGATGCTGTGTCTGCTGGGAG CCGGATCTGTGGCCGCTGGCGTGATCCAGAGCCCCAG ACACCTGATCAAAGAGAAGCGGGAGACAGCCACCCTG AAGTGCTACCCCATCCCCGGCACGACACCGTGTACTG GTATCAGCAGGGACCAGGACAGGACCCCCAGTTCTCTG ATCAGCTTCTACGAGAAGATGCAGAGCGACAAGGGCA GCATCCCCGACAGATTCAGCGCCCAGCAGTTCAGCGA CTACCACAGCGAGCTGAACATGAGCAGCCTGGAAGT GGCGACTCTGCCCTGTACTTCTGCGCCAGCAGCCAGAA GCAGGGCTGGGAGAAGCTGTTCTTCGGCAGCGGCACC CAGCTGTCCGTGCTG (SEQ ID NO: 8)

[0092] Las longitudes de la cadena alfa del TCR (región VJ), de la cadena beta del TCR (región VDJ) y de CDR3 se designan según los datos IMGT (IMGT, El sistema de información internacional ImMunoGeneTics®, <http://imgt.cines.fr>).

5 Ejemplo 2

[0093] En el ejemplo 1, se proporcionan los datos en los que se comparan dos clones de células T que reconocen específicamente un péptido derivado de la tirosinasa (es decir, YMDGTMSQV denominada a partir de ahora en este documento como YMD) presentado por moléculas HLA-A*0201. El clon de células T T8 era un clon de células T específico de péptido alorrestingido derivado de un donante negativo para HLA-A2. El clon de células T IVS-B se derivó de un paciente positivo para HLA-A*0201 que sufría melanoma metastásico. Este melanoma expresaba tirosinasa.

[0094] En este ejemplo se han extendido las comparaciones para incluir un ejemplo de un clon de células T, D115 que también deriva de un individuo positivo para HLA-A*0201 y reconoce el mismo péptido YMD. Sin embargo, al contrario que el clon IVS-B, el clon D115 se generó *in vitro* usando células T respondedoras derivadas de la sangre de un individuo sano. Por tanto, no se ha producido un posible impacto negativo sobre este clon de células T debido al desarrollo del tumor (es decir, el melanoma) *in vivo*.

[0095] En la figura 6 se muestra la comparación del patrón de reconocimiento de la célula diana del nuevo clon D115 y del clon T58 que es materia de esta patente. Como puede observarse claramente, tanto D115 como T58 muestran el mismo patrón de reconocimiento, detectado mediante secreción de interferón gamma (eje y), tras el cultivo conjunto con diversas líneas celulares tumorales (eje x y leyenda de la figura). Ninguno de los clones reconoce las células tumorales que son negativos para HLA-A2, pero expresan tirosinasa, ni reconocen células tumorales que sean positivas para HLA-A2 y negativas para tirosinasa. Por otro lado, ambos clones de células T reconocen diversas líneas celulares tumorales que son positivas para HLA-A2 y para tirosinasa. El papel del péptido YMD en este reconocimiento se demuestra mediante el hallazgo de que las células tumorales positivas para HLA-A2 que no expresan tirosinasa a partir de la cual el péptido YMD podría ser procesado internamente y transportado a la superficie celular mediante las moléculas HLA-A2 para su presentación, puede cargarse con péptido YMD sintético, lo que lleva a su reconocimiento por D115 y T58. De este modo, ambos clones muestran la misma especificidad para el péptido YMD presentado por moléculas HLA-A2. Sin embargo, la eficacia de reconocimiento mostrado por el clon T58 es mucho mayor que la del clon D115, como se observa por los niveles de secreción de interferón gamma. Por ejemplo, esto lleva a un reconocimiento insignificante de la línea celular de melanoma SK-Mel-29 por parte D115, aunque se observa un claro reconocimiento por parte de T58.

[0096] Los TCR de los clones D115 y T58 se expresaron como proteínas recombinantes en linfocitos receptores activos (figura 7). Cuando estos linfocitos transducidos con TCR se probaron de nuevo con el mismo panel de células diana, mostraron el mismo patrón de especificidad que los clones de células T originales, lo que demuestra que el reconocimiento de TCR era responsable de los resultados observados en la figura 6. De nuevo, en la figura 7 se muestra que el TCR del clon T58 muestra un reconocimiento superior de las líneas celulares tumorales de melanoma que expresan HLA-A2 y tirosinasa y las células tumorales positivas para HLA-A2 pulsadas con péptido YMD.

[0097] En la figura 8A se muestra que los linfocitos transducidos con TCR presentan niveles comparables de expresión de los TCR recombinantes respectivos, teniendo cada población transducida aproximadamente el 11 % de células T que se unen a un multímero MHC que comprende moléculas de HLA-A2 que presenta el péptido YMD. Esta unión no se observa en los multímeros control que presentan otros péptidos derivados de la proteína pp65 de citomegalovirus humano.

[0098] Cuando las dos poblaciones de PBL transducidos con TCR se estimulan con células presentadoras de antígeno positivas para HLA-A2 (es decir, células T2) que se pulsan con diferentes concentraciones de péptido YMD (mostrado en el eje x), puede verse que las células que expresan TCR-T58 liberan el 50 % de sus niveles máximos de interferón gamma (eje y) a concentraciones de péptido 100 veces menores. Este ensayo de sensibilidad al péptido muestra que el clon TCR-T58 tiene una avidéz funcional mucho mayor cuando se compara con TCR-D115 (figura 8B).

[0099] Esta diferencia se ejemplifica adicionalmente mediante la fuerte diferencia en los niveles máximos de interferón gamma producido por los linfocitos transducidos con TCR-T58 frente a TCR-D 115. En el caso de células

TCR-T58, el máximo alcanza 5.000 pg/ml mientras que esto da lugar a solo aproximadamente 2.000 pg/ml para TCR-D 115 en 24 horas. Adicionalmente, la cantidad de péptido que las células T2 deberían presentar para inducir una liberación de 2.000 pg/ml de interferón-gamma es 15.000 veces más baja que para desencadenar este nivel de respuesta a partir de linfocitos transducidos con TCR-T58 en comparación con los linfocitos transducidos con TCR-D115 (figura 8C).

[0100] En la figura 8D se muestra otro ensayo de sensibilidad al péptido, esta vez usando células mononucleares de sangre periférica que se han pulsado con cantidades de valoración del péptido YMD (eje x). Una vez más, las cantidades de liberación de interferón gamma por los linfocitos que expresan TCR-T58 son mucho mayores en comparación con TCR-D115. Las flechas muestran que la primera detección de secreción de citoquinas se produce con 100 veces menos péptidos para TCR-T58 en comparación con TCR-D115.

[0101] En las figuras 8E y 8F se muestra la especificidad de las poblaciones de linfocitos transducidos por las células tumorales pulsadas con el péptido (figura 8E) o por líneas celulares tumorales que expresan HLA-A2 y tirosinasa (figura 8F). En todos los casos, el reconocimiento es superior por parte de los linfocitos que expresan TCR-T58 en comparación con TCR-D115.

[0102] La secreción superior de citoquinas no se limita al interferón gamma. Los niveles de secreción de interleuquina 2, TNF-alfa y MIP-1beta también son superiores para TCR-T58. Esto se observa tras la estimulación de los linfocitos transducidos con TCR por las células tumorales y las células T2 pulsada con péptido (figura 9).

Material y procedimientos

Líneas celulares

[0103] Las líneas celulares de melanoma humano, Mel-A375 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁻; CRL-1619, American Type Culture Collection (ATCC)), Mel-93.04A12 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁺; cedida por P. Schrier, Department of Immunohematology, Leiden University Hospital, Países Bajos), Mel-624.38¹ y SK-Mel-23 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁺; cedidas por M. C. Panelli, National Institutes of Health, Bethesda, MD), SK-Mel-28 (HLA-A2⁻, tirosinasa⁺; MTB-72, ATCC), SK-Mel-29 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁺, cedida por P. Rieber, Institute of Immunology, Technical University Dresden, Alemania), WM-266-4 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁺; CRL-1676, ATCC) y cultivos primarios de un melanoma humano (6-12 subcultivos) y MaCa1 (HLA-A2⁻, tirosinasa⁻, cedida por R. Wank, M.D. Munich, Alemania), transfectante estable HLA-A*0201 de MaCa1 (MaCa1/A2) (HLA-A2⁺, tirosinasa⁻, cedida por E. Noessner, Institute of Molecular Immunology, Helmholtz Zentrum Munich, Alemania), RCC-262 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁻), PancTu 1 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁻, cedida por P. Nelson, Department for Biological Chemistry University Hospital LMU Munich, Alemania), UTS CC 1588 (HLA-A2⁺, tirosinasa⁻, cedida por M. Schmitz, Institute of Immunology, Technical University Dresden, Alemania) así como la línea celular linfocida T2 (CRL-1992, ATCC) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal de ternera (SFT) al 12 %, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y aminoácidos no esenciales.

Carga del péptido de células T2, PBMC y células tumorales

[0104] Para pulsar el péptido exógeno, se incubaron 1×10^6 células T2 a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 2 h con 10 µg/ml de microglobulina β₂ humana (Calbiochem) y cantidades de valoración que oscilaban de 10⁻⁵ M a 10⁻¹¹ M del péptido de la tirosinasa YMD (tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ YMDGTMSQV, Metabion). Las células T2 pulsadas con 10⁻⁵ M de péptido GIL del virus de la gripe (gripe: proteína de la matriz del virus de la gripe₅₈₋₆₆ GILGFVFTL, Metabion) sirvieron como control negativo. Los PBMC se cargaron con el péptido de la tirosinasa al igual que las células T2 con cantidades de valoración que oscilaban de 10⁻⁶ a 10⁻¹¹ M. Las células tumorales se cargaron con 10⁻⁵ M de péptido de la gripe o 10⁻⁵ M de péptido de la tirosinasa YMD como se describió en el caso de las células T2. Tras el lavado, las células T2 cargadas con el péptido, los PBMC o las células tumorales se usaron como células estimulantes en los ensayos de liberación de IFN-γ.

Ensayos de citoquinas

[0105] Para la investigación de la especificidad, se incubaron CTL (2×10^3 células en 100 µl) con diversos tipos de líneas celulares tumorales (1×10^4 células en 100 µl) con o sin pulsado de péptido, como se describe anteriormente. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron después de 24 h de cultivo conjunto y se ensayaron

mediante un ELISA estándar usando el set de IFN- γ humano OptEIA™ (BD Biosciences). Los datos representan los valores medios con las desviaciones medias correspondientes calculadas a partir de determinaciones duplicadas. Para el cálculo del % de liberación relativa de IFN- γ , se estableció la liberación máxima de IFN- γ como valor de referencia del 100 % y se calcularon los valores correspondientes a esta referencia. Para estudiar simultáneamente múltiples citoquinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α y MIP-1 β) su secreción se midió en los sobrenadantes de cultivos conjuntos de CTL con células tumorales y con o sin células T2 pulsadas o no con péptido de la tirosinasa (10^{-5} M) usando la tecnología del sistema de matrices de proteínas múltiples (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Transferencia retroviral del gen de TRC

10

[0106] Para la identificación del TCR de los CTL específicos de tumor, se amplificaron las regiones de las cadenas TCR α y TCR β que codifican la CDR3 mediante PCR usando un panel de cebadores de TCRV α y TCRV β en combinación con cebadores de la región constante respectivos como se describe³. Los genes completos de las cadenas TCR α y TCR β de los clones de CTL T58 y D115 se amplificaron mediante PCR usando ADNc como molde. Las secuencias cebador se proporcionarán bajo pedido. Las regiones constantes de ambas cadenas de TCR se intercambiaron por las homólogas murinas para aumentar la estabilidad del TCR⁴. Las cadenas de TCR se unieron mediante un enlazador peptídico 2A (TCR β -P2A-TCR α)⁵, con clones optimizados (Genearth)⁶ y clonados en el vector retroviral MP71PRE a través de sitios de restricción para NotI y EcoRI. Los plásmidos vectores retrovirales se transfectaron conjuntamente en células 293T con plásmidos de expresión que codifican los genes MLV gag/pol y MLV-10A1 env del virus Moloney, respectivamente para producir retrovirus amfotróficos MLV pseudotipados como se ha descrito previamente⁵. Diez días después de la segunda transducción, los PBL se tiñeron usando multímero A2-tyr marcado con PE y anticuerpo específico de CD8 marcado con FITC. Se usaron como controles multímeros que presentaban péptidos derivados de citomegalovirus pp65: los multímeros pp65₄₁₇₋₄₂₇ (B7-pp65) HLA-B7 marcados con PE sirven como control de HLA y los multímeros pp65₄₉₅₋₅₀₃ HLA-A2 como control específico de péptido. El día 15, se realizó un ensayo de liberación de IFN- γ usando células T2 o PBMC autólogos cargados con cantidades graduales de péptido de tirosinasa (10^{-12} M - 10^{-5} M) y las líneas celulares tumorales MaCa1, SK-Mel-28, Mel-A375, RCC-26, PancTu 1, MaCa1/A2, UTS CC 1588, Mel-624.38, Mel-93.04A12, SK-Mel-23, SK-Mel-29 y WM-266-4 como células estimulantes en una relación E: T de 2: 1.

30 Bibliografía

[0107]

1. Liao, X., y col. Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Mol Ther* 9, 757 – 764 (2004).
2. Javorovic, M., y col. Inhibitory effect of RNA pool complexity on stimulatory capacity of RNA-pulsed dendritic cells. *J Immunother* 31, 52 – 62 (2008).
3. Altman, J.D., y col. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94 – 96 (1996).
4. Ho, W.Y., Nguyen, H.N., Wolf, M., Kuball, J. & Greenberg, P.D. In vitro methods for generating CD8+ T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. *J Immunol Methods* 310, 40 – 52 (2006).
5. Wolfel, T., y col. Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL). *Int J Cancer* 55, 237 – 244 (1993).
6. Margulies, D.H. TCR avidity: it's not how strong you make it, it's how you make it strong. *Nat Immunol* 2, 669 – 670 (2001).
7. Palermo, B., y col. Qualitative difference between the cytotoxic T lymphocyte responses to melanocyte antigens in melanoma and vitiligo. *Eur J Immunol* 35, 3153 – 3162 (2005).
8. Engels, B., y col. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 14, 1155 – 1168 (2003).

9. Heemskerk, M.H., y col. Redirection of antileukemic reactivity of peripheral T lymphocytes using gene transfer of minor histocompatibility antigen HA-2-specific T-cell receptor complexes expressing a conserved alpha joining region. *Blood* 102, 3530 – 3540 (2003).
- 5 10. Rivoltini, L., y col. Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 55, 3149 – 3157 (1995).
11. Wolf, M., y col. Quantitation of MHC tetramer-positive cells from whole blood: evaluation of a single-platform, six-parameter flow cytometric method. *Cytometry A* 57, 120 – 130 (2004).
- 10 12. Zhou, D., y col. High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells. *Lab Invest* 86, 314 – 321 (2006).
13. Steinle, A., Reinhardt, C., Jantzer, P. & Schendel, D.J. In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *J Exp Med* 181, 503 – 513 (1995).
- 15 14. Leisegang, M., y col. Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med* 86, 573 – 583 (2008).
- 20 15. Kieback, E., Charo, J., Sommermeyer, D., Blankenstein, T. & Uckert, W. A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 623 – 628 (2008).
16. Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, H., Arcese W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L. Niederwieser, B. y col. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86: 2041.
- 25 17. Kolb, H. J., Schmid, C., Barrett, A. J. y Schendel, D. J. (2004). Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 103: 767 – 776.
- 30 18. Dudley, M.E. y Rosenberg, S.A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature Reviews Cancer* 3: 666 – 675.
19. Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E., Rosenberg, S. A. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298: 850 – 854.
- 35 20. Engels, B., Nössner, E., Frankenberger, B., Blankenstein, Th., Schendel, D.J., y W. Uckert. 2005. Redirecting human T lymphocytes towards renal cell carcinoma-specificity by retroviral transfer of T cell receptor genes. *Human Gene Ther.*, 16(7): 79.9 – 810
- 40 21. Rivoltini L, Barracchini KC, Viggiano V, y col. Quantitative correlation between HLA class I allele expression and recognition of melanoma cells by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 1995; 55: 3149 – 3157.
- 45 22. Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, y col. Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol.* 1993; 151: 4209 – 4220.
- 50 23. Steinle A, Reinhardt C, Jantzer P, Schendel DJ. In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *J Exp Med.* 1995; 181: 503 – 513.
- 55 24. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res.*

2006; 66: 8878 – 8886.

25. Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, y col. Enhanced functionality of T cell receptor-redirected T cells is defined by the transgene cassette. J Mol Med 86, 573 – 583 (2008).

5

26. Scholten KB, Kramer D, Kueter EW, y col. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. Clin Immunol. 2006; 119: 135 – 145.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

[0108]

- < 110 > Helmholtz-Zentrum Munich
- < 120 > Receptor de células T de alta afinidad y uso del mismo
- 15 < 130 > P28549
- < 140 >
- < 141 >
- < 150 > EP08020396.1
- < 151 > 2008-11-24
- 20 < 160 > 8
- < 170 > PatentIn versión 3.3
- < 210 > 1
- < 211 > 813
- < 212 > ADN
- 25 < 213 > Artificial
- < 220 >
- < 223 > Secuencia de la cadena alfa del TCR
- < 400 > 1

```

atgtggggag tttccttct ttatgtttcc atgaagatgg gaggcactac aggacaaaac      60
attgaccagc cactgagat gacagctacg gaagggtgcca ttgtccagat caactgcacg      120
taccagacat ctgggttcaa cgggctgttc tgggtaccagc aacatgctgg cgaagcacc      180
acatttctgt cttacaatgt tctggatggt ttggaggaga aaggctgttt ttcttcattc      240
cttagtcggt ctaaagggta cagttacctc cttttgaagg agctccagat gaaagactct      300
gcctcttacc tctgtgctgt gacatactct ggggctggga gttaccaact cactttcggg      360
aaggggacca aactctcggt cataccaa atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag      420
ctgagagact ctaaatccag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa      480
acaaatgtgt cacaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac tgtgctagac      540
atgaggctta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaaca atctgacttt      600
gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt cccagccca      660
gaaagttcct gtgatgtcaa gctggtcgag aaaagctttg aacagatac gaacctaac      720
tttcaaaacc tgtcagtgat tgggttccga atcctcctcc tgaaagtggc cgggtttaat      780
30 ctgctcatga cgctgaggct gtggtccagc tga      813

```

- < 210 > 2
- < 211 > 960
- < 212 > ADN

ES 2 394 180 T3

< 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Secuencia de la cadena beta del TCR
 < 400 > 2

5 atgcttagtc ctgacctgcc tgactctgcc tggaaacacca ggctcctctg ccatgtcatg 60
 ctttgtctcc tgggagcagg ttcagtggct gctggagtca tccagtcccc aagacatctg 120
 atcaaagaaa agagggaaac agccactctg aaatgctatc ctatccctag acacgacact 180
 gtctactggg accagcaggg tccaggtcag gacccccagt tcctcatttc gttttatgaa 240
 aagatgcaga gcgataaagg aagcatccct gatcgaattct cagctcaaca gttcagtgac 300
 tatcattctg aactgaacat gagctccttg gagctggggg actcagccct gtacttctgt 360
 gccagcagtc agaaacaggg ctgggaaaaa ctgttttttg gcagtggaac ccagctctct 420
 gtcttggagg acctgaaca ggtgttccca cccgaggctg ctgtgtttga gccatcagaa 480
 gcagagatct cccacacca aaaggccaca ctgggtgtgcc tggccacagg cttcttcct 540
 gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat ggggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcacg 600
 gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc 660
 cgcttgaggg tctcggccac cttctggcag aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc 720
 cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag tggaccagg atagggccaa acccgtcacc 780
 cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga gcagactgtg gctttacctc ggtgtcctac 840
 cagcaagggg tcctgtctgc caccatcctc tatgagatcc tgctagggaa ggccaccctg 900
 tatgctgtgc tggtcagcgc cttgtgttg atggccatgg tcaagagaaa ggatttctga 960

< 210 > 3
 10 < 211 > 39
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Secuencia de nucleótidos de la CDR3 en la cadena alfa del TCR
 15 < 400 > 3

tgctctga cactctgg ggctgggagt taccaactc 39

< 210 > 4
 20 < 211 > 36
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Secuencia de nucleótidos de la CDR3 en la cadena beta del TCR
 25 < 400 > 4

tgccagca gtcagaaaca gggctgggaa aaactg 36

< 210 > 5
 30 < 211 > 13
 < 212 > PROT
 < 213 > Artificial

ES 2 394 180 T3

atgctgtccc ccgatctgcc cgacagcgcc tggaaacacca gactgctgtg ccacgtgatg	60
ctgtgtctgc tgggagccgg atctgtggcc gctggcgtga tccagagccc cagacacctg	120
atcaaagaga agcgggagac agccaccctg aagtgtacc ccatcccccg gcacgacacc	180
gtgtactggt atcagcaggg accaggacag gacccccagt tcctgatcag cttctacgag	240
aagatgcaga gcgacaaggg cagcatcccc gacagattca gcgcccagca gttcagcgac	300
taccacagcg agctgaacat gaggagcctg gaactgggcg actctgccct gtacttctgc	360
gccagcagcc agaagcaggg ctgggagaag ctgttcttcg gcagcggcac ccagctgtcc	420
gtgctg	426

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica las regiones V(D)J de un TCR que reconoce la tirosinasa y comprende la secuencia de ácido nucleico SEC ID N.º 1 que codifica la cadena α y/o la secuencia de ácido nucleico SEC ID N.º 2 que codifica la cadena β de dicho TCR, o un derivado del mismo que codifica las cadenas α o β , donde la cadena se ha alterado mediante una o más adiciones o deleciones de 1 – 15 aminoácidos, estando las adiciones o deleciones fuera de la región CDR3 de cada cadena y/o mediante sustituciones conservadoras de 1 – 15 aminoácidos, en la que las características de reconocimiento de la tirosinasa se mantienen o mejoran,
- 10 o un fragmento de la misma que codifica una región CDR3 de un TCR que reconoce la tirosinasa y que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de las SEC ID N.º 3 o 4 o que codifica las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N.º 5 o 6,
- o un derivado de dicho fragmento, en el que se ha alterado la región CDR3 mediante una o más adiciones y/o deleciones de un número total de hasta 1 – 5 aminoácidos, pero no más de 1 – 3 aminoácidos contiguos, y/o sustituciones conservadoras de hasta 1 – 6 aminoácidos y en la que las características de reconocimiento de la tirosinasa se mantienen o mejoran.
- 20 2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que la secuencia que codifica las cadenas α o β derivan de SEC ID N.º 1 y 2 mediante optimización de codones y comprende la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N.º 7 que codifica la cadena α y/o comprende la secuencia de ácido nucleico SEC ID N.º 8 que codifica la cadena β de dicho TCR.
- 25 3. Un TCR, preferiblemente un TCR soluble, que comprende regiones V(D)J que codifican un ácido nucleico de una o más de las reivindicaciones 1 – 2 o comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N.º 5 y/o 6.
4. Una proteína de fusión de las cadenas α y/o β de TCR funcional que comprende:
- 30 a) al menos una etiqueta epítome, y
b) la secuencia de aminoácidos de una cadena α y/o β de un TCR según una o más de las reivindicaciones 1 – 3,
- en la que dicha etiqueta epítome se selecciona entre
- 35 i) una etiqueta epítome añadida a los extremos N y/o C terminales de dichas cadenas α y/o β , o se añade a la secuencia de las cadenas α y/o β , pero fuera de la región CDR3,
ii) una etiqueta epítome insertada en una región constante de dichas cadenas α y/o β , y
iii) una etiqueta epítome que sustituye a diversos aminoácidos de la región constante de dichas cadenas α y/o β .
- 40 5. Una célula T que expresa un TCR de las reivindicaciones 3 o 4, o un TCR que comprende una de las regiones CDR3 de la reivindicación 1.
6. Una molécula de inmunoglobulina, anticlina, cadena γ/δ del TCR que tiene una región CDR3 de la reivindicación 1 insertada.
- 45 7. Un vector, preferiblemente un plásmido, vector lanzadera, fagémido, cósmido, vector de expresión, vector retroviral, vector adenoviral o partícula y/o vector para su uso en terapia génica, que comprende uno o más de los ácidos nucleicos de las reivindicaciones 1 – 2 o un ácido nucleico que codifica un TCR según las reivindicaciones 3 o 4.
- 50 8. Una célula, preferiblemente un PBL, que se ha transformado con el vector de la reivindicación 7.
9. Una composición farmacéutica que comprende un TCR de la reivindicación 3 o 4, una célula T de la reivindicación 5, una molécula de inmunoglobulina, anticlina, cadena γ/δ del TCR de la reivindicación 6 o la célula de la reivindicación 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una perfusión o inyección.
- 55 10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad en pacientes mediante terapia celular adoptiva.
- 60

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que los pacientes son preferiblemente pacientes positivos para HLA-A2 y la enfermedad implica la aparición de células neoplásicas que expresan tirosinasa, preferiblemente melanomas, gliomas, glioblastomas y/o tumores raros de origen ectodérmico.

Figura 1: Selección inicial para células T específicas del péptido de la tirosinasa
Especificidad: HLA-A2 + péptido de la tirosinasa YMDGTMSQV

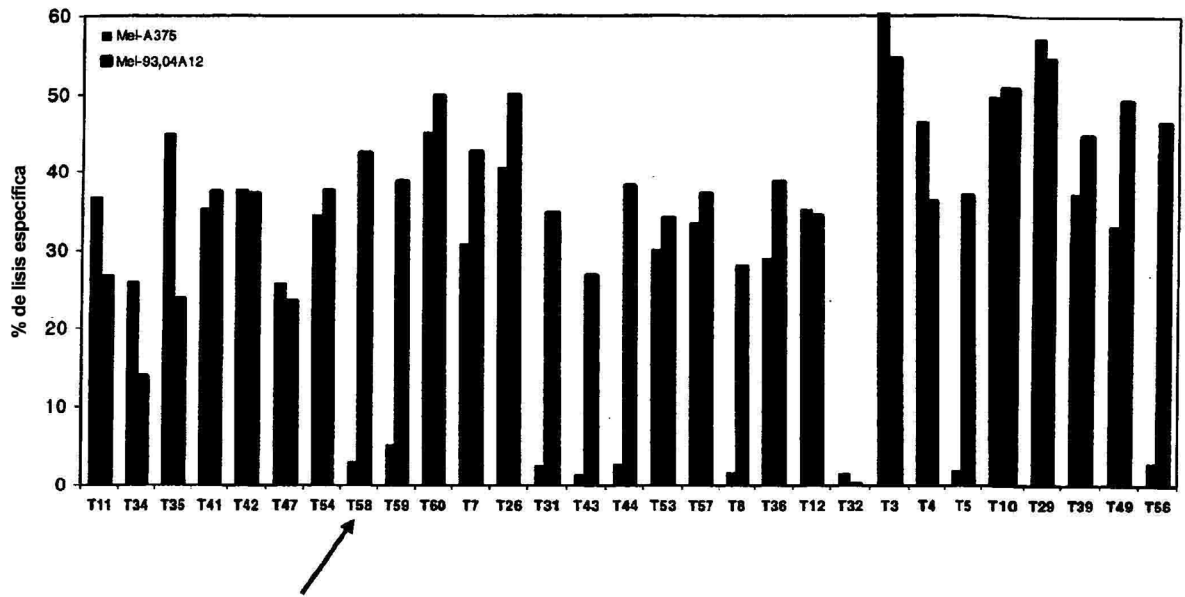
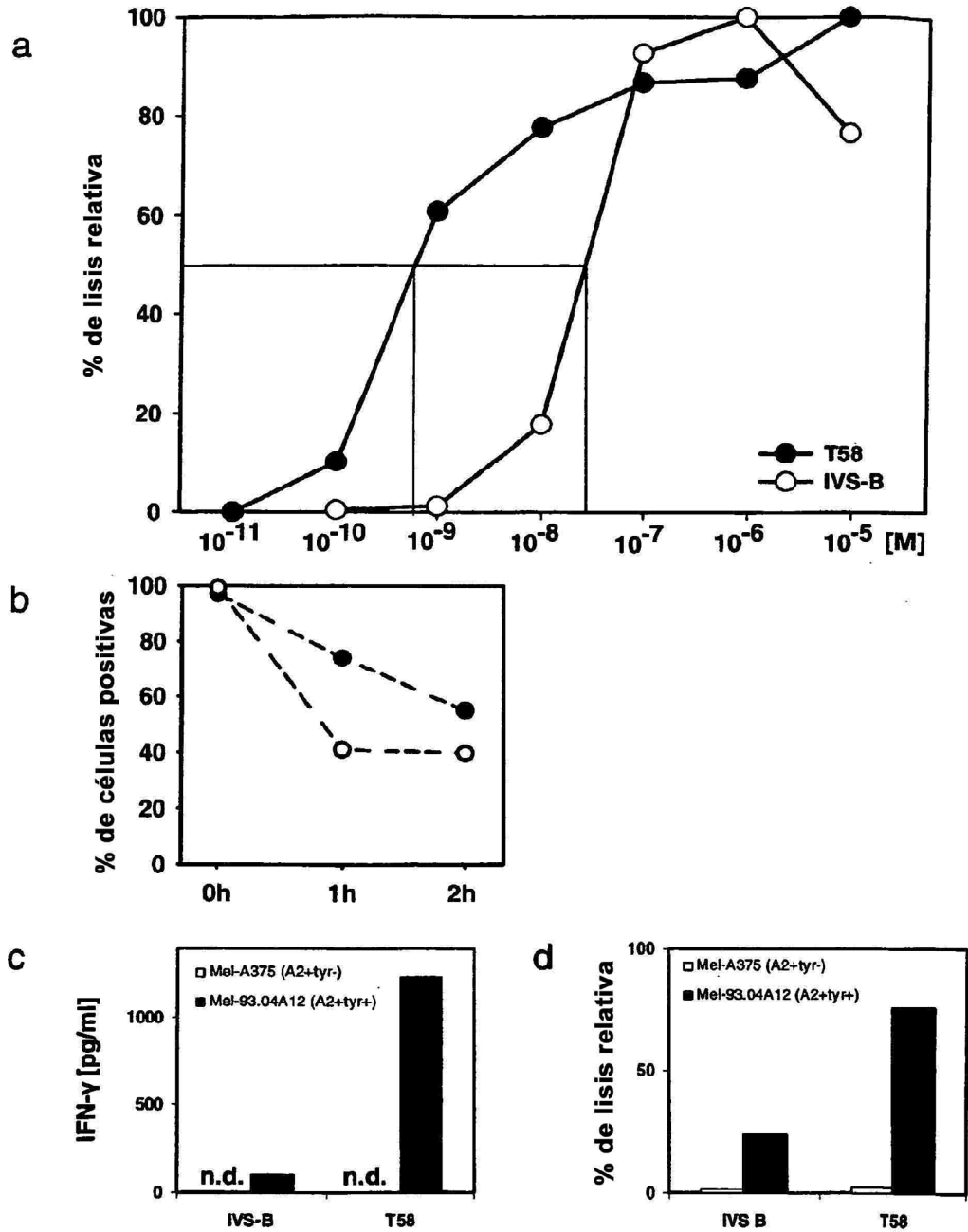


Figura 2: Clon de células T alorrestingido T58 frente a clon de células T derivado de un paciente IVS-B
 Especificidad: HLA-A2 + péptido de la tirosinasa YMDGTMSQV



**Figura 3: Clon de células T alorrestingido T58 frente a clon de células T derivado de un paciente IVS-B
Reconocimiento de las células del tumor primario**

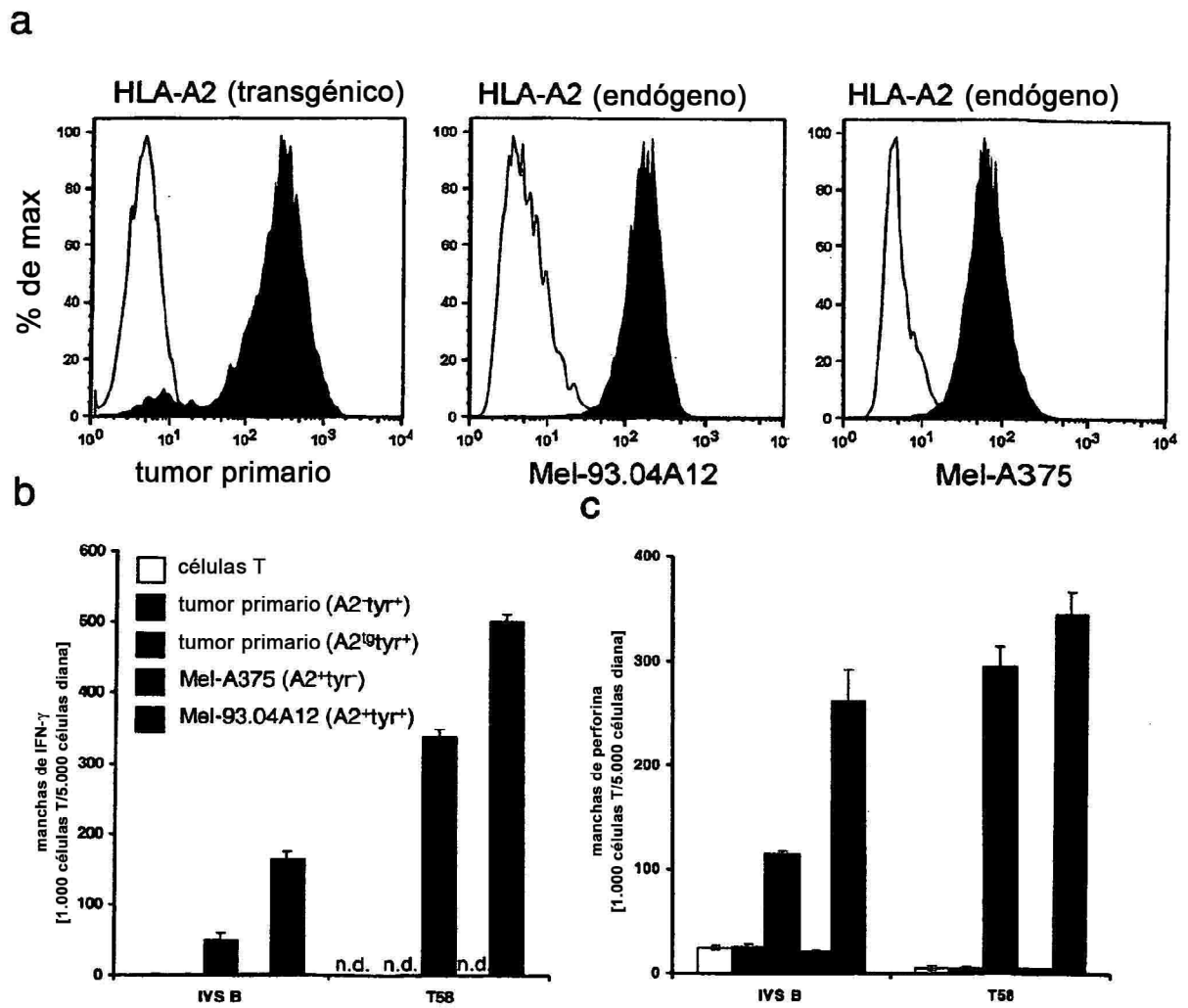


Figura 4: PBL transducidos con TCR-T58
 Especificidad: HLA-A2 + péptido de la tirosinasa YMDGTMSQV

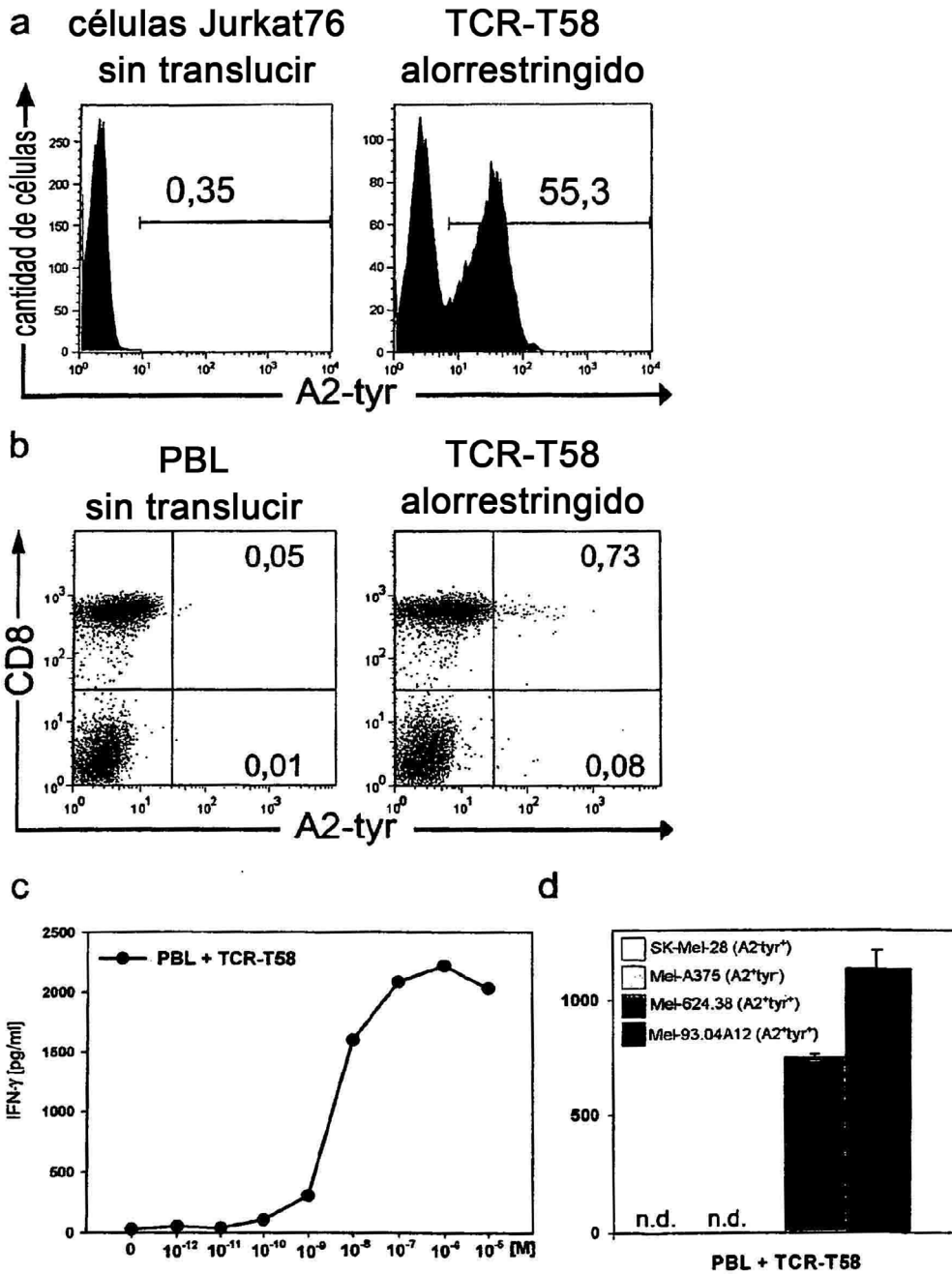
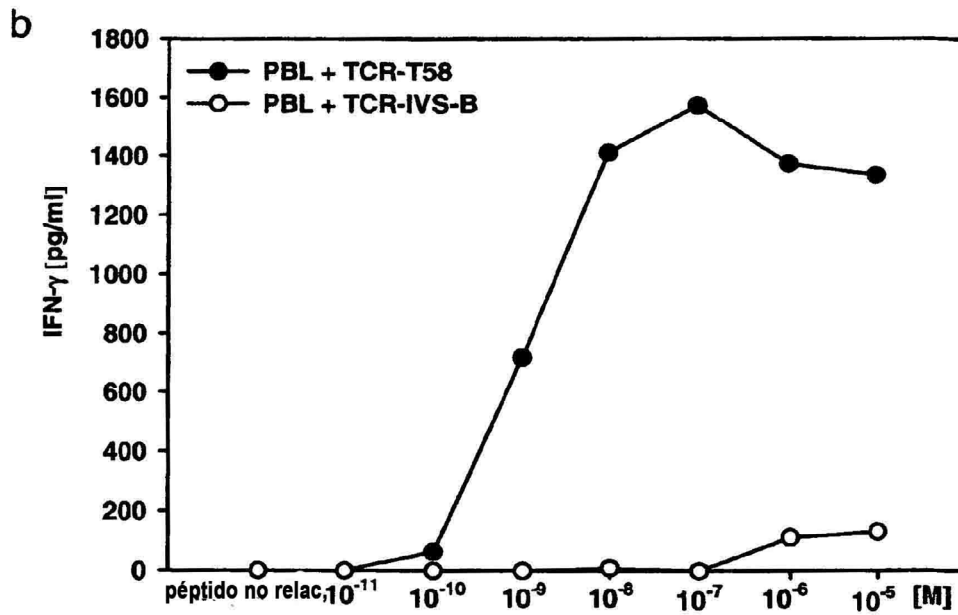
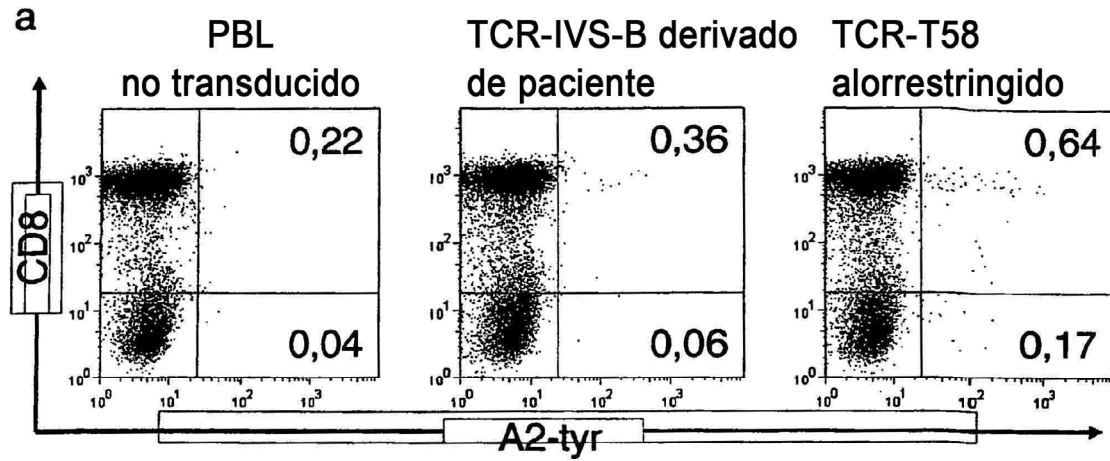


Figura 5: PBL transducidos con TCR-IVS-B frente a TCR-T58
 Especificidad: HLA-A2 + péptido de la tirosinasa YMDGTMSQV



Las capacidades funcionales difieren entre las células D115 autorrestringidas y las células T58 alorrestringidas

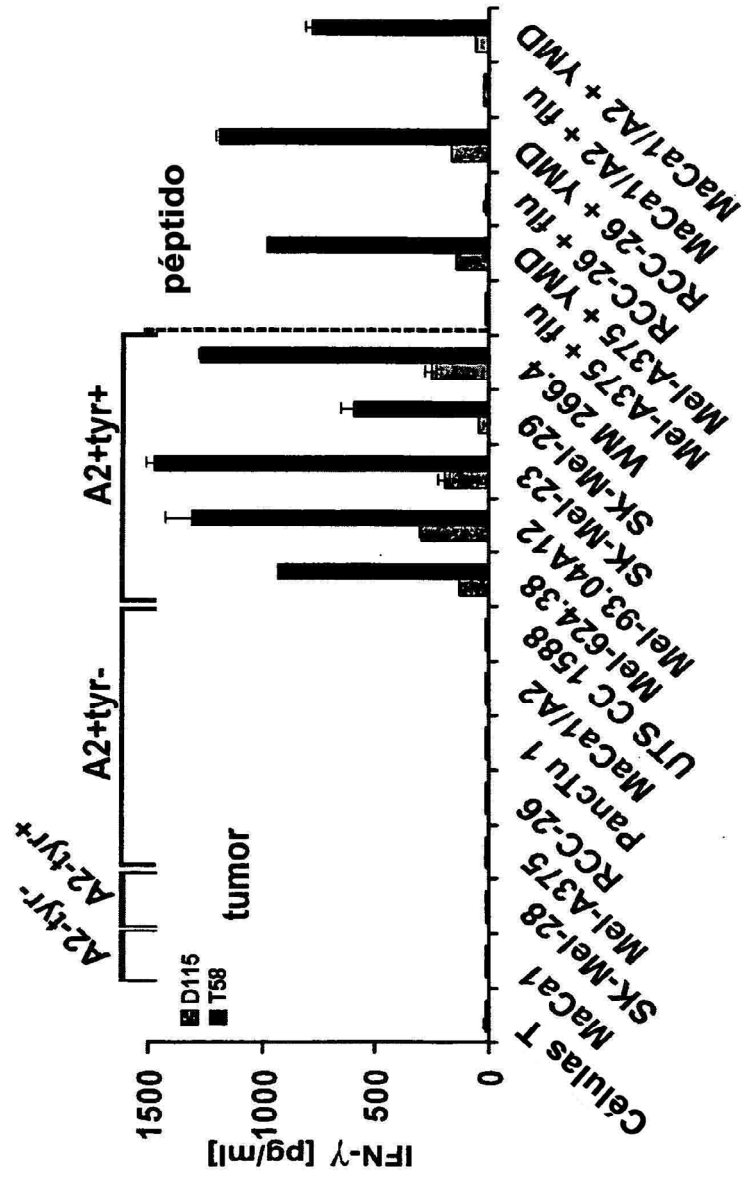


Figura 6

Especificidad de reconocimiento de las células tumorales mediante linfocitos transducidos con TCR

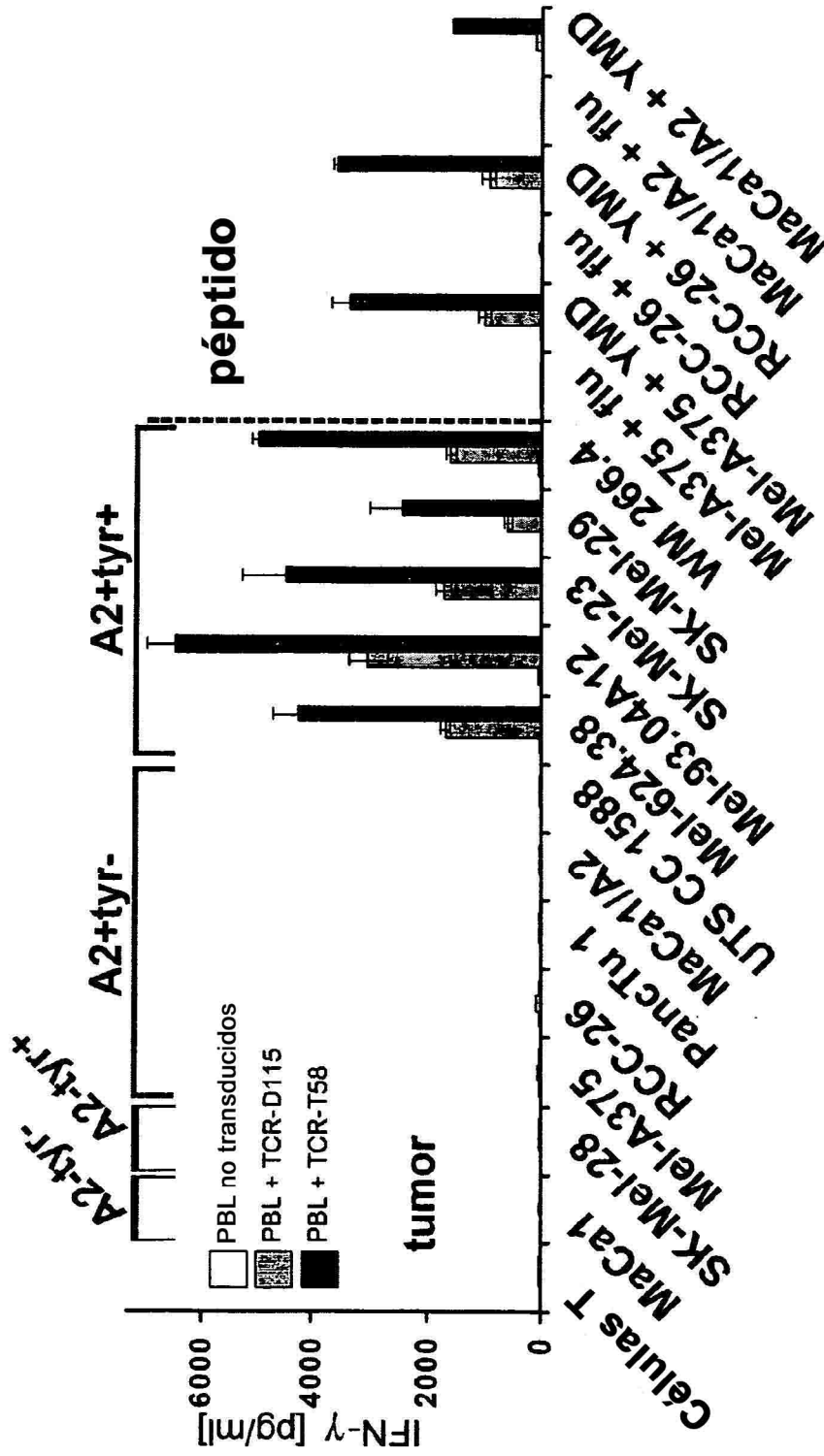


Figura 7

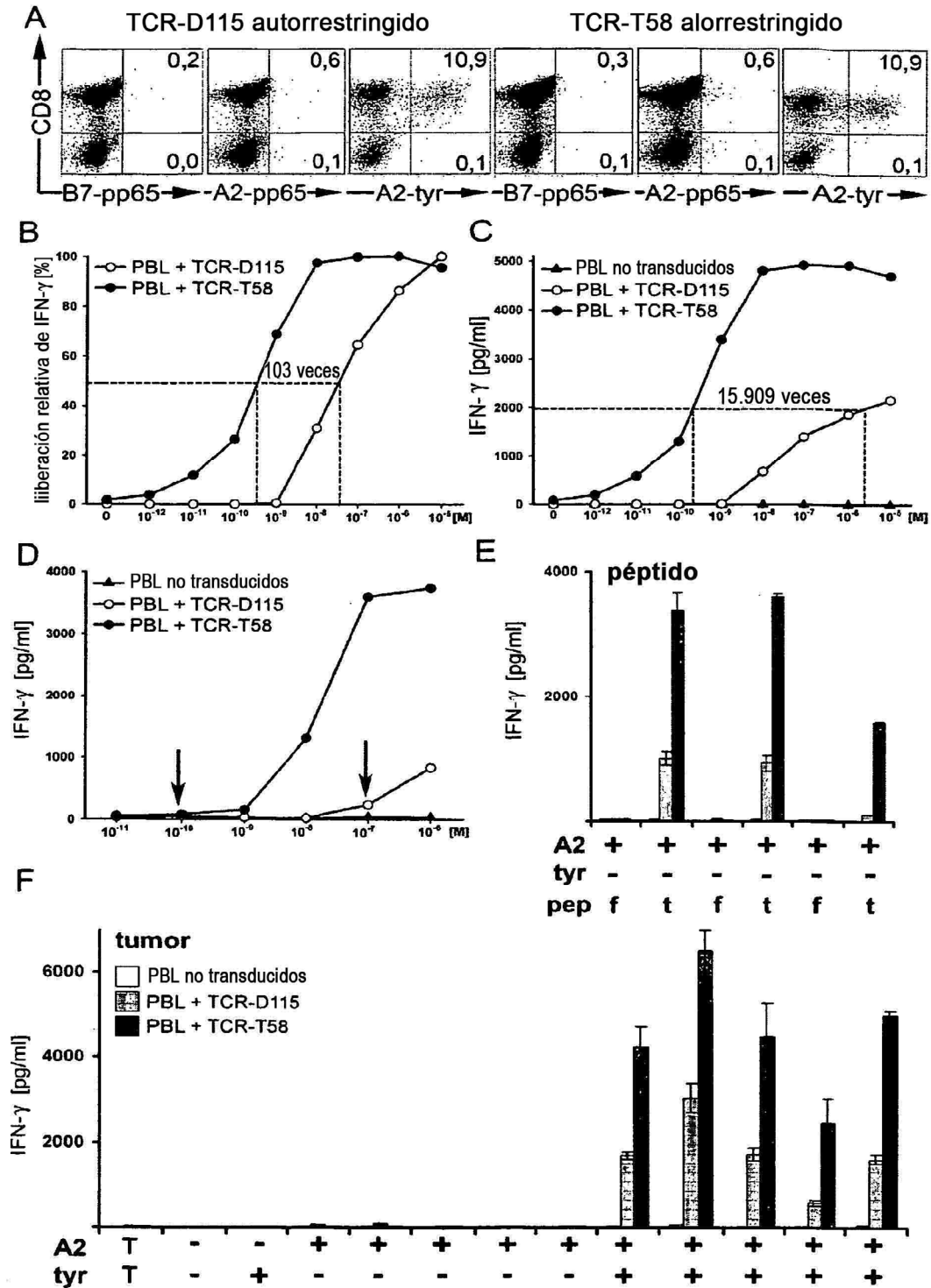


Figura 8

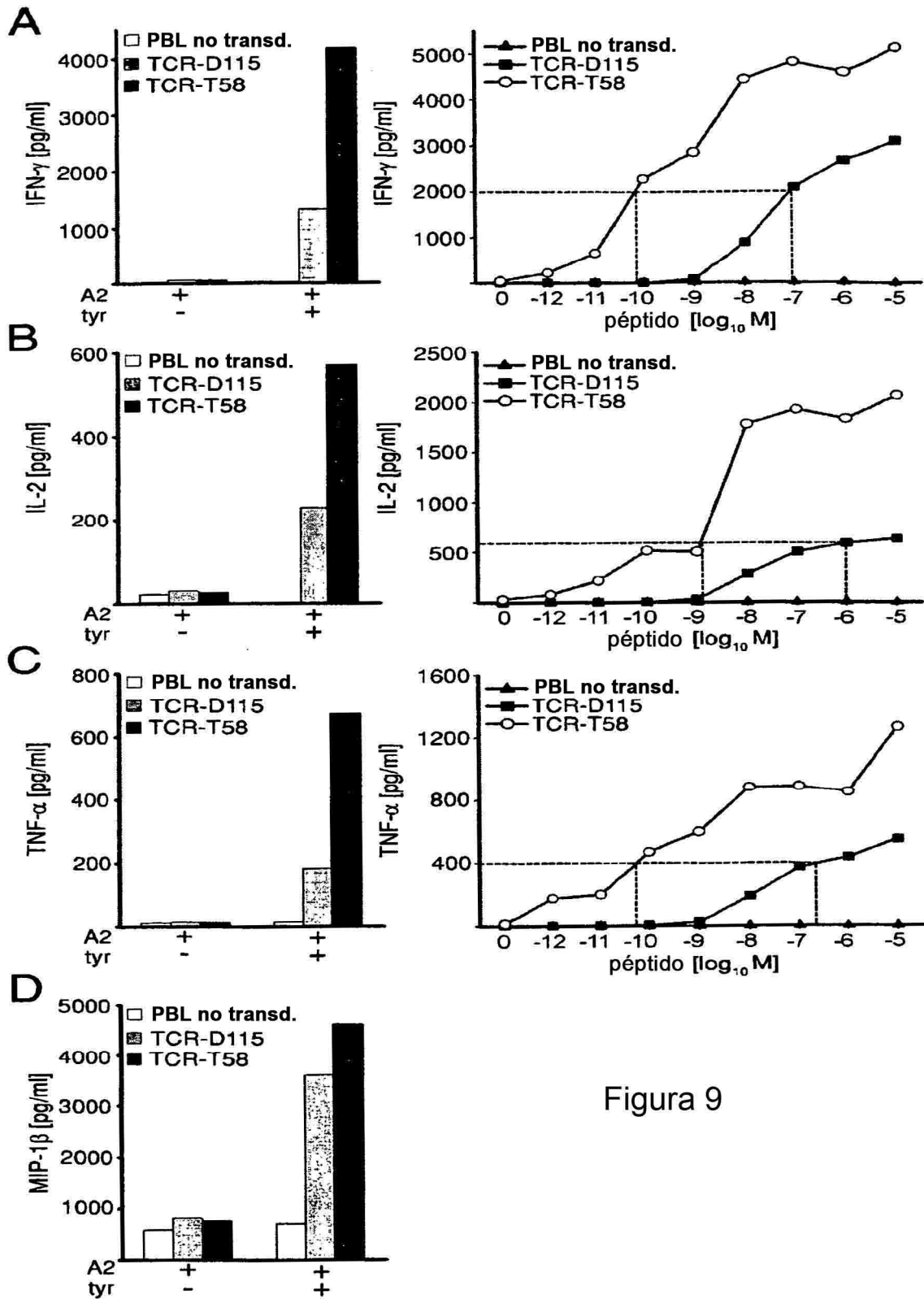


Figura 9