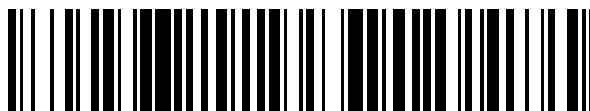


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 691**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2003 E 09001469 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2048159**

54 Título: **Presentación del receptor de linfocitos T**

30 Prioridad:

**09.11.2002 GB 0226227**  
**25.01.2003 GB 0301814**  
**22.02.2003 GB 0304067**  
**16.04.2003 US 463046 P**  
**16.05.2003 GB 0311397**  
**11.07.2003 GB 0316356**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.03.2014**

73 Titular/es:

**IMMUNOCORE LTD. (50.0%)**  
**57c Milton Park**  
**Abingdon Oxford OX14 4RX, GB y**  
**ADAPT IMMUNE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JAKOBSEN, BENT KARSTEN;**  
**ANDERSEN, TORBEN BENT;**  
**MOLLOY, PETER EAMON;**  
**LI, YI y**  
**BOULTER, JONATHAN MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 451 691 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

Presentación del receptor de linfocitos T

- 5 La presente invención se refiere a partículas proteicas, por ejemplo partículas fágicas o ribosómicas, que presentan receptores de linfocitos T (TCR) y a colecciones variadas de éstas.

Antecedentes de la invención

- 10 TCR nativos

Como se describe por ejemplo en WO 99/60120, los TCR median el reconocimiento por los linfocitos T de complejos específicos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)-péptido y, como tales, son esenciales para el funcionamiento de la rama celular del sistema inmunitario.

- 15 Los anticuerpos y los TCR son los únicos dos tipos de moléculas que reconocen antígenos de manera específica, y por lo tanto el TCR es el único receptor para antígenos peptídicos particulares presentados por el MHC, siendo a menudo el péptido foráneo el único signo de una anomalía dentro de una célula. El reconocimiento por un linfocito T se produce cuando un linfocito T y una célula presentadora de antígeno (APC) están en contacto físico directo y se inicia mediante la unión de los TCR específicos del antígeno con los complejos pMHC.

- 20 El TCR nativo es una proteína heterodimérica de la superficie celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se asocia a proteínas invariables del complejo CD3 implicado en la mediación de la transducción de señales. Los TCR existen en las formas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , que son estructuralmente similares pero tienen localizaciones anatómicas, y probablemente funciones, bastante distinguibles. Los ligandos del MHC de clase I y clase II también son proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas pero están especializados en la presentación de antígenos, con un sitio de unión del péptido altamente polimórfico que les permite presentar una matriz variada de fragmentos de péptidos cortos en la superficie de las células APC.

- 25 Se conocen otras dos clases de proteínas capaces de funcionar como ligandos de los TCR. (1) los antígenos CD1 son moléculas relacionadas a MHC clase I cuyos genes se encuentran en un cromosoma diferente del de los antígenos clásicos MHC de clase I y clase II. Las moléculas CD1 son capaces de presentar grupos peptídicos y no peptídicos (por ejemplo lípidos, glucolípidos) a los linfocitos T de manera análoga a los complejos MHC-pep convencionales de las clases I y II. Véase, por ejemplo (Barclay et al, (1997) *The Leucocyte Antigen Factsbook* 2<sup>a</sup> Edición, Academic Press) y (Bauer (1997) *Eur J Immunol* 27 (6) 1366-1373)) (2) Los superantígenos bacterianos con toxinas solubles capaces de unirse tanto a moléculas de MHC clase II como a un subconjunto de TCR. (Fraser (1989) *Nature* 339 221-223) Muchos superantígenos tienen especificidad por uno o dos segmentos Vbeta, mientras que otros muestran una unión más promiscua. En cualquier caso, los superantígenos son capaces de suscitar una mayor respuesta inmunitaria en virtud de su capacidad de estimular los subconjuntos de linfocitos T de forma policlinal.

- 30 La porción extracelular de los TCR heterodiméricos nativos  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  consiste en dos polipéptidos, cada uno de los cuales tiene un dominio constante proximal a la membrana y un dominio variable distal a la membrana. Cada uno de los dominios constante y variable incluye un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios variables contienen bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos. Las CDR3 de los TCR  $\alpha\beta$  interactúan con el péptido presentado por MHC, y las CDR 1 y 2 de los TCR  $\alpha\beta$  con el péptido y el MHC. La diversidad de las secuencias de los TCR se genera a través del reordenamiento somático de variable unida (V), diversidad (D), unión (J) y genes constantes

- 35 Los polipéptidos de cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  funcionales están formados por regiones V-J-C reordenadas, mientras que las cadenas  $\beta$  y  $\delta$  consisten en regiones V-D-J-C. El dominio extracelular constante tiene una región proximal a la membrana y una región de inmunoglobulina. Hay dominios constantes de una sola cadena  $\alpha$  y  $\delta$ , conocidos como TRAC y TRDC, respectivamente. El dominio constante de la cadena  $\beta$  se compone de uno de los dos dominios constantes  $\beta$  diferentes, conocidos como TRBC1 y TRBC2 (nomenclatura de IMGT). Existen cuatro cambios de aminoácidos entre estos dominios constantes  $\beta$ , tres de los cuales están dentro de los dominios utilizados para producir los TCR de una sola cadena presentados en las partículas fágicas de la presente invención. Estos cambios están todos dentro del exón 1 de TRBC1 y TRBC2: N<sub>4</sub>K<sub>5</sub>->K<sub>4</sub>N<sub>5</sub> y F<sub>37</sub>->Y (numeración IMGT, diferencias TRBC1->TRBC2), con el cambio de aminoácido final entre las dos regiones constantes de la cadena  $\beta$  de TCR en el exón 3 de TRBC1 y TRBC2: V<sub>1</sub>->E. El dominio constante  $\gamma$  se compone de uno de TRGC1, TRGC2(2x) o TRGC2(3x). Los dos dominios constantes TRGC2 difieren solamente en el número de copias de los aminoácidos codificados por el exón 2 de este gen que están presentes.

La extensión de cada uno de los dominios extracelulares de TCR es algo variable. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar fácilmente la posición de los límites del dominio utilizando una referencia como The T Cell

Receptor Facts Book, Lefranc & Lefranc, Publ. Academic Press 2001.

TCR recombinantes

5 La producción de TCR recombinantes es beneficiosa ya que proporciona análogos de TCR solubles adecuados para los propósitos siguientes:

- Estudiar las interacciones TCR / ligando (por ej. pMHC para los TCR  $\alpha\beta$ )
- Detectar inhibidores de las interacciones asociadas a TCR
- 10 • Proporcionar la base para posibles terapias

Una serie de constructos han sido concebidos hasta la fecha para la producción de TCR recombinantes. Estos constructos caen dentro de dos amplias clases, los TCR de una sola cadena y los TCR diméricos, la bibliografía pertinente para estos constructos se resume más adelante.

15 Los TCR de una sola cadena (scTCR) son constructos artificiales que constan de una sola hebra de aminoácidos, que al igual que los TCR heterodiméricos nativos se unen a complejos MHC-péptido. Desafortunadamente, los intentos de producir scTCR análogos alfa/beta funcionales, simplemente uniendo las cadenas alfa y beta de modo que ambas se expresen en un marco de lectura abierto no han tenido éxito, presumiblemente debido a la inestabilidad natural del apareamiento del dominio soluble alfa-beta.

En consecuencia, han sido necesarias técnicas especiales que usan diferentes truncamientos de una o ambas de las cadenas alfa y beta para la producción de los scTCR. Estos formatos parecen ser aplicables solamente a una gama muy limitada de secuencias de los scTCR. Soo Hoo et al (1992) PNAS. 89 (10): 4759-63 informan acerca de la expresión de un TCR de ratón en un formato de una sola cadena a partir del clon 2C del linfocito T utilizando una cadena beta y alfa truncada unida con un conector de 25 aminoácidos y expresión en periplasma bacteriano (véase también Schodin et al (1996) Mol. Immunol. 33 (9): 819-29). Este diseño también forma la base de TCR de una sola cadena m6 informado por Holler et al (2000) PNAS. 97 (10): 97 (10): 5387-92 que se deriva de scTCR 2C y se une al mismo aloepitopo restringido al H2-Ld. Shusta et al (2000) Nature Biotechnology 18: 754-759 y US 6,423,538 informan el uso de constructos TCR 2C murinos de una sola cadena en experimentos de presentación en levaduras, que produjeron TCR mutados con mayores estabilidad térmica y solubilidad. Este informe también demostró la capacidad de estos TCR 2C presentados de unirse selectivamente a células que expresan su pMHC análogo. Khandekar et al (1997) J. Biol Chem 272 (51): 32190-7 informan de un diseño similar para el TCR D10 murino, aunque este scTCR se fusionó a MBP y se expresó en el citoplasma bacteriano (véase también Hare et al (1999) Nat. Struct. Biol 6 (6): 574-81). Hilyard et al (1994) PNAS. 91 (19): 9057-61 informan de un scTCR humano específico para la proteína de matriz del virus de la gripe en HLA-A2, usando un diseño de  $V\alpha$ -conector- $V\beta$  y y expresado en periplasma bacteriano.

40 Chung et al (1994) PNAS. 91 (26) 12654-8 Informan de la producción de un scTCR humano utilizando un diseño  $V\alpha$ -conector- $V\beta$ - $C\beta$  y expresión en la superficie de una línea celular de mamífero. Este informe no incluye ninguna referencia a la unión específica péptido-HLA de scTCR. Plaksin et al (1997) J. Immunol. 158 (5): 2218-27 informan de un diseño de  $V\alpha$ -conector- $V\beta$ - $C\beta$  similar para producir un scTCR murino específico para un epítipo gp120-H-2D<sup>d</sup> de VIH. Este scTCR se expresa como cuerpos de inclusión bacterianos y se repliega in vitro.

45 Una serie de documentos describen la producción de heterodímeros de TCR que incluyen el puente disulfuro nativo que conecta las subunidades respectivas (Garboczi, et al., (1996), Nature 384(6605): 134-41; Garboczi, et al., (1996), J Immunol 157(12): 5403-10; Chang et al., (1994), PNAS USA 91: 11408-11412; Davodeau et al., (1993), J. Biol. Chem. 268(21): 15455-15460; Golden et al., (1997), J. Imm. Meth. 206: 163-169; patente de Estados Unidos N° 6080840). Sin embargo, aunque dichos TCR pueden ser reconocidos por anticuerpos específicos para TCR, no se demostró que ninguno reconociera su ligando nativo a ninguna otra concentración que las relativamente altas y/o no fueron estables.

55 En WO 99/60120, se describe un TCR soluble que está plegado correctamente de modo que es capaz de reconocer su ligando nativo, es estable durante un período de tiempo, y se puede producir en cantidades razonables. Este TCR comprende un dominio extracelular de cadena  $\alpha$  o  $\gamma$  de TCR dimerizado a un dominio extracelular de cadena  $\beta$  o  $\delta$  de TCR, respectivamente, por medio de un par de péptidos de dimerización C-terminal, como cremalleras de leucina. Esta estrategia de producción de los TCR se aplica generalmente a todos los TCR.

60 Reiter et al, Immunity, 1995, 2:281-287, detalla la construcción de una molécula soluble que contiene dominios variables  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR estabilizados por disulfuro, uno de los cuales está unido a una forma truncada de exotoxina de Pseudomonas (PE38). Una de las razones indicadas para la producción de esta molécula fue superar la inestabilidad inherente a los TCR de una sola cadena. La posición del nuevo enlace disulfuro en los dominios variables de TCR se identificó mediante homología con los dominios variables de los anticuerpos, en los cuales éstos habían sido introducidos previamente (por ejemplo véase Brinkmann, et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA

90: 7538-7542, y Reiter, et al. (1994) *Biochemistry* 33: 5451-5459). Sin embargo, como no hay tal homología entre los dominios constantes de los TCR y los anticuerpos, esta técnica no se pudo emplear para identificar sitios apropiados para nuevos enlaces disulfuro intercatenarios entre dominios constantes de TCR.

5 Como se mencionó antes Shusta et al (2000) *Nature Biotechnology* 18:754-759 informan el uso de constructos TCR 2C de una sola cadena en experimentos de presentación en levaduras. El principio de presentación de scTCR en partículas fágicas se trató previamente. Por ejemplo, WO 99/19129 detalla la producción de scTCR y resume un método potencial para la producción de partículas fágicas que presentan los scTCR del formato V $\alpha$ -conector-V $\beta$  C $\beta$ . Sin embargo, esta solicitud no contiene ejemplificación que demuestre la producción de dichas partículas fágicas que presentan TCR. No obstante, la solicitud hace referencia a una solicitud en trámite:

"La construcción de vectores de ADN con un segmento de ADN que codifica las moléculas de sc-TCR fusionadas a una proteína de la cápside de un bacteriófago (gen II o gen VIII) se describió en dicha solicitud en trámite U.S. N° 08/813,781".

15 Además, esta solicitud se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-TCR o complejos superantígeno MHC para reconocer los scTCR solubles, no presentados en fago, producidos para verificar su correcta conformación. Por lo tanto, la especificidad de unión verdadera de péptido-MHC de los scTCR, en cualquier formato, no está demostrada concluyentemente.

20 Finalmente, otro estudio (Onda et al., (1995) *Molecular Immunology* 32 (17-18) 1387-1397) da a conocer la presentación en fago de dos cadenas  $\alpha$  de TCR murinos en ausencia de sus respectivas cadenas  $\beta$ . Este estudio demostró que las partículas fágicas que presentan una de las cadenas  $\alpha$  de TCR (derivada del hibridoma murino A1.1) unidas preferencialmente a los mismos péptidos inmovilizados en pocillos de microtitulación que el TCR completo, normalmente responderían a cuando fueron presentadas por el MHC I-A<sup>d</sup> murino clase I.

25 **Uso en cribado**

30 Varias interacciones celulares y respuestas celulares importantes, incluida la sinapsis inmunológica mediada por TCR, son controladas mediante contactos realizados entre receptores de la superficie celular y ligandos presentados en las superficies de otras células. Estos tipos de contactos moleculares específicos son de vital importancia para la regulación bioquímica correcta en el cuerpo humano y por lo tanto, se están estudiando intensamente. En muchos casos, el objetivo de estos estudios es idear una forma de modulación de las respuestas celulares con el fin de prevenir o combatir enfermedades.

35 Por lo tanto, los métodos con los cuales identificar compuestos que se unen con algún grado de especificidad a las moléculas de receptor o ligando humanas son importantes como pistas para el descubrimiento y el desarrollo de nuevas terapias de enfermedades. En particular, los compuestos que interfieren con ciertas interacciones receptor-ligando tienen potencial inmediato como agentes terapéuticos o portadores.

40 Los avances en la química combinatoria, que permiten la producción relativamente fácil y rentable de grandes quimiotecas han incrementado enormemente el alcance de las pruebas de compuestos. Ahora las limitaciones de los programas de cribado residen muy a menudo en la naturaleza de los ensayos que se pueden emplear, la producción de moléculas de receptor y ligando adecuadas y cuán bien se pueden adaptar estos ensayos a métodos de cribado de alto rendimiento.

45 **Métodos de presentación**

50 A menudo es deseable presentar un determinado péptido o polipéptido en la superficie de una partícula proteica. Dichas partículas pueden servir como auxiliares de purificación para el péptido o polipéptido (puesto que las partículas que transportan el péptido o polipéptido se pueden separar de los contaminantes no deseados por sedimentación u otros métodos). También pueden servir como partículas para vacunación, siendo estimulada la respuesta inmunitaria al péptido o polipéptido presentado en la superficie mediante la presentación de partículas. La proteína p24 del retrotransposón de levadura, y la proteína de superficie de la cápside del virus de la hepatitis B son ejemplos de proteínas que se autoensamblan en partículas. La fusión del péptido o polipéptido de interés a estas proteínas formadoras de partícula es una forma reconocida de presentar el péptido o polipéptido en la superficie de las partículas resultantes.

60 Sin embargo, principalmente se han utilizado métodos de presentación en partículas para identificar proteínas con propiedades deseables como mayores rendimientos de expresión, características de unión y/o estabilidad. Estos métodos implican la creación de una agrupación o 'colección' variada de proteínas o polipéptidos expresados en la superficie de partículas proteicas. Estas partículas tienen dos características clave, en primer lugar cada partícula presenta una proteína o un polipéptido de una sola variante y en segundo lugar el material genético que codifica la proteína o el polipéptido expresados está asociado al de la partícula. Esta colección se somete después a una o más rondas de selección. Por ejemplo, esto puede consistir en poner en contacto un ligando con una colección de

presentación en partículas de receptores mutados e identificar qué receptores mutados se unen al ligando con la mayor afinidad. Una vez finalizado el proceso de selección el receptor o los receptores con las propiedades deseadas se pueden aislar y su material genético se puede amplificar para permitir la secuenciación de los mismos.

5 Estos métodos de presentación se dividen en dos amplias categorías, presentación in vitro e in vivo.

Todos los métodos de presentación in vivo se basan en un paso en el cual la colección, generalmente codificada en o con el ácido nucleico genético de una partícula replicable como un replicón plasmídico o fágico se transforma en las células, para permitir la expresión de proteínas o polipéptidos. (Plückthun (2001) *Adv Protein Chem* 55 367-403).

10 Existen varios sistemas replicón/huésped que han demostrado ser adecuados para la presentación in vivo de proteínas o polipéptidos. Estos incluyen los siguientes

Fago / células bacterianas

Plásmido / células CHO

Vectores basados en el plásmido de 2  $\mu$ m de levadura / células de levadura

15 Baculovirus / células de insectos

Plásmido / células bacterianas

Los métodos de presentación in vivo incluyen métodos de presentación en la superficie celular en los cuales un plásmido se introduce en la célula huésped que codifica una proteína de fusión que consiste en la proteína o el polipéptido de interés fusionados a una proteína o un polipéptido de la superficie de la célula. La expresión de esta proteína de fusión produce la presentación de la proteína o el polipéptido de interés en la superficie de la célula. Las células que presentan estas proteínas o estos polipéptidos de interés se pueden someter después a un proceso de selección como FACS y los plásmidos obtenidos de la célula o las células seleccionadas se pueden aislar y secuenciar. Se han diseñado sistemas de presentación en superficie celular para células de mamíferos (Higuschi (1997) *J Immunol. Methods* 202 193-204), células de levaduras (Shusta (1999) *J Mol Biol* 292 949-956) y células bacterianas (Sameulson (2002) *J. Biotechnol* 96 (2) 129-154).

20 Se han publicado numerosas revisiones de las diversas técnicas de presentación in vivo. Por ejemplo, (Hudson (2002) *Expert Opin Biol Ther* (2001) 1 (5) 845-55) y (Schmitz (2000) 21 (Supp A) S106-S112).

Los métodos de presentación in vitro se basan en el uso de ribosomas para traducir bancos de ARNm en una matriz de variantes de proteínas o polipéptidos. La unión entre las proteínas o los polipéptidos formados y el ARNm que codifica estas moléculas se mantiene mediante uno de dos métodos. La presentación en ribosoma convencional utiliza secuencias de ARNm que codifican una secuencia conectora corta (típicamente 40-100 aminoácidos) y la proteína o el polipéptido que se va a presentar. La secuencia conectora proporciona a la proteína o el polipéptido presentados espacio suficiente para que se vuelvan a plegar sin impedimento estérico por parte del ribosoma. La secuencia de ARNm carece de un codón de 'parada', esto asegura que la proteína o el polipéptido expresados y el ARN permanezcan unidos a la partícula del ribosoma. El método de presentación relacionado al ARNm se basa en la preparación de las secuencias de ARNm que codifican la proteína o el polipéptido de interés y conectores de ADN que acarrean un residuo de puromicina. Tan pronto como el ribosoma alcanza el empalme ARNm/ADN la traducción se paraliza y la puromicina forma un enlace covalente con el ribosoma. Por una revisión reciente de estos dos métodos de presentación in vitro relacionados, véase (Amstutz (2001) *Curr Opin Biotechnol* 12 400-405).

45 Se prefiere particularmente la técnica de presentación en fago que se basa en la capacidad de las partículas de bacteriófago para expresar un péptido o polipéptido heterólogo fusionado a sus proteínas de superficie. (Smith (1985) *Science* 217 1315-1317). El procedimiento es bastante general y bien comprendido en el área de la presentación de monómeros de polipéptidos. Sin embargo, en el caso de polipéptidos que en su forma nativa se asocian como dímeros, sólo la presentación en fago de anticuerpos parece haber sido investigada a fondo.

50 Para la presentación de polipéptidos monoméricos existen dos procedimientos principales:

En primer lugar (método A) insertar en un vector (fagómido) ADN que codifica el péptido o polipéptido heterólogo fusionado al ADN que codifica una proteína de la cápside del bacteriófago. La expresión de partículas fágicas que presentan el péptido o polipéptido heterólogo se realiza después transinfectando células bacterianas con el fagómido y luego infectando las células transformadas con un 'fago auxiliar'. El fago auxiliar actúa como fuente de las proteínas del fago no codificadas por el fagómido necesarias para producir una partícula fágica funcional.

60 En segundo lugar (método B), insertar ADN que codifica el péptido o polipéptido heterólogo en un genoma completo del fago fusionado con el ADN que codifica una proteína de la cápside del bacteriófago. La expresión de partículas fágicas que presentan el péptido o polipéptido heterólogo se realiza después infectando células bacterianas con el genoma del fago. Este método tiene la ventaja del primer método de ser un proceso de un 'solo paso'. Sin embargo, se reduce el tamaño de la secuencia de ADN heterólogo que puede ser empacada con éxito en las partículas fágicas resultantes. M13, T7 y Lambda son ejemplos de fagos adecuados para este método.

Una variación en el (método B) implica agregar una secuencia de ADN que codifica un dominio de unión a nucleótidos al ADN del genoma del fago que codifica el péptido heterólogo que se va a presentar y agregar además el sitio correspondiente de unión de nucleótidos al genoma del fago. Esto hace que el péptido heterólogo se una directamente al genoma del fago. Este complejo péptido/genoma se empaqueta en una partícula fágica que presenta el péptido heterólogo. Este método se describe completamente en WO 99/11785.

Después las partículas fágicas se pueden recuperar y utilizar para estudiar las características de unión del péptido o polipéptido heterólogo. Una vez aislado, el fagómido o ADN del fago se puede recuperar de la partícula fágica que presenta el péptido o polipéptido, y este ADN se puede replicar por PCR. El producto de PCR se puede utilizar para secuenciar el péptido o polipéptido heterólogo presentado por una determinada partícula fágica.

La presentación en fago de anticuerpos de una sola cadena y sus fragmentos, se ha convertido en un medio habitual para estudiar las características de unión de estos polipéptidos. Se dispone de numerosos libros que revisan técnicas de presentación en fago y la biología de los bacteriófagos. (Véase, por ejemplo, Phage Display - A Laboratory Manual, Barbas et al., (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press).

Un tercer método de presentación en fago (método C) se basa en el hecho de que polipéptidos heterólogos que tienen un residuo de cisteína en una ubicación deseada pueden ser expresados en una forma soluble por un fagómido o genoma de fago y causar que se asocien con una proteína modificada de la superficie del fago, que también tiene un residuo de cisteína en una posición expuesta de la superficie, mediante la formación de un enlace disulfuro entre las dos cisteínas. WO 01/05950 detalla el uso de este método de unión alternativo para la expresión de péptidos derivados de anticuerpos de una sola cadena.

#### Breve descripción de la invención

Los TCR nativos son heterodímeros que tienen largos dominios transmembrana que son esenciales para mantener su estabilidad como dímeros funcionales. Como hemos mencionado antes, los TCR son útiles para investigación y fines terapéuticos en sus formas solubles así que la presentación de la forma nativa insoluble tenga poca utilidad. Por otra parte, se ha demostrado que las formas solubles estables de los TCR son difíciles de diseñar, y puesto que la mayor parte de los métodos de presentación parecen haber sido descritos únicamente para péptidos y polipéptidos monoméricos, los métodos de presentación adecuados para los TCR diméricos solubles no han sido investigados. Además, puesto que la funcionalidad de TCR presentado depende de la asociación adecuada de los dominios variables del dímero de TCR, la presentación exitosa de un TCR dimérico funcional no es trivial.

WO 99/18129 contiene la declaración: "los constructos de ADN que codifican las proteínas de fusión sc-TCR se pueden utilizar para crear una colección de presentación en bacteriófagos según los métodos descritos en la solicitud en trámite U.S. N1 de serie 08/813.781 presentada el 7 de marzo de 1997, cuya divulgación se incorpora en este documento por referencia", pero no se incluye ninguna descripción real de dicha presentación en esta solicitud. Sin embargo, los inventores de esta solicitud publicaron un documento (Weidanz (1998) J Immunol Methods 221 59-76) que demuestra la presentación de dos scTCR murinos en partículas fágicas.

WO 01/62908 da a conocer métodos para la presentación en fago de proteínas de fusión de scTCR y scTCR/Ig. No obstante, no se evaluó la funcionalidad (unión específica a pMHC) de las constructos dados a conocer.

Por último, se demostró un método mediado por retrovirus para la presentación de colecciones variadas de TCR en la superficie de linfocitos T inmaduros para un TCR murino. La colección de TCR mutados presentados en la superficie de los linfocitos T inmaduros se cribó por citometría de flujo usando tetrámeros de pMHC y esto condujo a la identificación de variantes de TCR que fueron específicas para el pMHC análogo, o una de sus variantes. (Helmut et al., (2000) PNAS 97 (26) 14578-14583)

Esta invención se basa en parte en el hallazgo de que los TCR de una sola cadena y diméricos se pueden expresar como fusiones de superficie a partículas fágicas y torna disponibles partículas fágicas que presentan constructos scTCR y dTCR alfa/beta análogos y gamma/delta análogos. Dichos TCR presentados en partículas fágicas son útiles para purificación y cribado, particularmente como una colección variada de TCR presentados en partículas para ciclos de selección por afinidad (biopanning) a fin de identificar los TCR con características deseables como alta afinidad por el complejo MHC-péptido diana. En la última conexión, los scTCR presentados en partículas pueden ser útiles para la identificación de TCR deseado, pero esa información se puede aplicar mejor a la construcción de TCR diméricos análogos para el uso extremo en terapia. La invención también incluye TCR de alta afinidad identificables por estos métodos

#### Descripción detallada de la invención

En un aspecto amplio, la presente invención proporciona una partícula fágica que presenta en su superficie un par de polipéptidos del receptor de linfocitos T dimérico (dTCR), donde dicho par de polipéptidos de dTCR está

constituido por un primer polipéptido en el cual una secuencia del dominio variable de la cadena  $\alpha$  o  $\delta$  de TCR se fusiona al extremo N terminal de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR y un segundo polipéptido donde una secuencia del dominio variable de la cadena  $\beta$  o  $\gamma$  de TCR se fusiona al extremo N terminal de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  de TCR; donde el primer y segundo polipéptidos están unidos por un enlace disulfuro que corresponde al enlace disulfuro intercatenario nativo presente en los TCR  $\alpha\beta$  diméricos nativos.

La partícula fágica de la invención puede ser una partícula de un fago filamentoso. La partícula fágica de la invención puede ser tal que el extremo C-terminal de un miembro del par de polipéptidos de dTCR esté unido por un enlace peptídico a un residuo expuesto en la superficie de la partícula fágica.

La invención también proporciona, como otro aspecto, una colección variada de partículas fágicas de conformidad con el primer aspecto. La variación puede residir en el o los dominios variables del par de polipéptidos de dTCR .

En una realización preferida, la invención proporciona una partícula fágica que presenta en su superficie un par de polipéptidos de receptores de linfocitos T diméricos (dTCR), donde el par de polipéptidos de dTCR está constituido por secuencias de aminoácidos de TCR correspondientes a secuencias extracelulares de los dominios constante y variable presentes en las cadenas de TCR nativos, y scTCR está constituido por secuencias extracelulares de aminoácidos de TCR correspondientes a secuencias de los dominios constante y variable presentes en las cadenas de TCR nativos y una secuencia conectora, donde esta última une una secuencia de dominio variable correspondiente a la de una cadena de un TCR nativo a una secuencia de dominio constante correspondiente a una secuencia de dominio constante de otra cadena de un TCR nativo; donde las secuencias de dominio variable del par de polipéptidos de dTCR están mutuamente orientadas sustancialmente como en los TCR nativos. En el caso de los scTCR o dTCR  $\alpha\beta$  presentados según la invención, el requisito de que las secuencias de dominio variable de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  estén mutuamente orientadas sustancialmente como en los receptores de linfocitos T  $\alpha\beta$  nativos es meramente una manera alternativa de decir que los TCR son funcionales, y esto se puede determinar confirmando que la molécula se une al ligando de TCR pertinente (complejo pMHC, complejo CD1-antígeno, superantígeno o complejo superantígeno/pMHC) - si se une, entonces el requisito se cumple. Las interacciones con complejos pMHC se pueden medir utilizando un instrumento Biacore 3000™ o Biacore 2000™. WO99/6120 proporciona descripciones detalladas de los métodos necesarios para analizar la unión de TCR a complejos MHC-péptido. Estos métodos son igualmente aplicables al estudio de las interacciones TCR/CD1 y TCR/superantígeno. Para aplicar estos métodos a estudio de las interacciones TCR/CD1 se requieren formas solubles de CD1, cuya producción se describe en (Bauer (1997) Eur J Immunol 27 (6) 1366-1373). En el caso de los TCR  $\gamma\delta$  de la presente invención los ligandos análogos para estas moléculas son desconocidos por lo tanto se pueden emplear medios secundarios para verificar su conformación como reconocimiento por anticuerpos. El anticuerpo monoclonal MCA991 T (comercializado por Serotec), específico para la región variable de la cadena  $\delta$ , es un ejemplo de un anticuerpo apropiado para esta tarea.

Los dTCR de la presente invención se pueden presentar en partículas fágicas, preferentemente partículas fágicas de fago filamentoso, mediante, por ejemplo, las dos maneras siguientes:

(i) El extremo C-terminal de un miembro del par de polipéptidos de dTCR o el extremo C-terminal de un péptido corto conector unido al extremo C-terminal de uno u otro, se puede unir directamente mediante un enlace peptídico a un residuo expuesto en la superficie de la partícula fágica. Por ejemplo, dicho residuo expuesto en la superficie está preferentemente en el extremo N-terminal del producto génico del gen III o gen VIII del bacteriófago; y

(ii) El extremo C-terminal de un miembro del par de polipéptidos de dTCR o el extremo C-terminal de un péptido corto conector unido al extremo C-terminal de uno u otro, se une mediante un enlace disulfuro a un residuo de cisteína expuesto en la superficie de la partícula proteica a través de un residuo de cisteína introducido. Por ejemplo, dicho residuo expuesto en la superficie está otra vez preferentemente en el extremo N-terminal del producto génico del gen III o gen VIII del bacteriófago.

Se prefiere el método (i) anterior. En el caso de un dTCR, el ácido nucleico que codifica una cadena de TCR se puede fusionar al ácido nucleico que codifica la partícula formadora de proteína o una proteína de superficie celular de la partícula replicable como un fago o una célula, y se puede permitir que la segunda cadena del par de polipéptidos de TCR se asocie con la partícula expresada resultante que presenta la primera cadena. La asociación funcional adecuada de las dos cadenas puede ser asistida por la presencia de cisteínas en el dominio constante de las dos cadenas que son capaces de formar un enlace disulfuro intercatenario, como se trata más detalladamente a continuación.

El dTCR presentado

El dTCR que se presenta en la partícula fágica puede ser uno que esté constituido por

un primer polipéptido en el cual una secuencia correspondiente a una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  o  $\delta$  de TCR está fusionada al extremo N terminal de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR y un segundo polipéptido en el cual una secuencia correspondiente a una secuencia del dominio variable de la cadena  $\beta$  o  $\gamma$  de TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  de TCR, donde el primer y segundo polipéptidos están unidos por un enlace disulfuro que corresponde al enlace disulfuro intercatenario nativo presente en los receptores de los linfocitos T  $\alpha\beta$  diméricos nativos.

Preferentemente, el dTCR se presenta en una partícula de un fago filamentosos y es uno que está constituido por

un primer polipéptido en el cual una secuencia correspondiente a una secuencia del dominio variable de la cadena  $\alpha$  de TCR está fusionada al extremo N terminal de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR, y

un segundo polipéptido en el cual una secuencia correspondiente a una secuencia del dominio variable de la cadena  $\beta$  de TCR está fusionada al extremo N terminal de una secuencia correspondiente a una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  de TCR,

el primer y segundo polipéptidos se pueden unir mediante un enlace disulfuro entre residuos de cisteína sustituidos por Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01 o sus equivalentes no humanos,

el extremo C-terminal de un miembro del par de polipéptidos de dTCR se puede unir mediante un enlace peptídico a una proteína de la cápside del fago.

Par de polipéptidos de dTCR

Las secuencias extracelulares del dominio constante presentes en los dTCR corresponden preferentemente a las de un TCR humano, al igual que las secuencias del dominio variable. Sin embargo, la correspondencia entre dichas secuencias no necesita ser 1:1 a nivel de aminoácidos. Es aceptable el truncamiento N- o C-, y/o la delección y/o sustitución de aminoácidos respecto a las secuencias del TCR humano correspondiente. En particular, debido a que las secuencias extracelulares del dominio constante presentes en el primer y segundo segmentos no están directamente involucradas en los contactos con el ligando al cual se unen el scTCR o dTCR, éstas pueden ser más cortas que, o pueden contener sustituciones o delecciones respecto a, las secuencias extracelulares del dominio constante de los TCR nativos.

La secuencia extracelular del dominio constante presente en uno de los polipéptidos del par de dTCR puede incluir una secuencia correspondiente al dominio Ig constante extracelular de una cadena  $\alpha$  de TCR, y/o la secuencia extracelular del dominio constante presente en el otro miembro del par puede incluir una secuencia correspondiente al dominio Ig constante extracelular de una cadena  $\beta$  de TCR.

En una realización de la invención, un miembro del par de polipéptidos de dTCR corresponde a sustancialmente todo el dominio variable de una cadena  $\alpha$  de TCR fusionada al extremo N terminal de sustancialmente todo el dominio extracelular del dominio constante de una cadena  $\alpha$  de TCR; y/o el otro miembro del par corresponde a sustancialmente todo el dominio variable de una cadena  $\beta$  de TCR fusionada al extremo N terminal de sustancialmente todo el dominio extracelular del dominio constante de una cadena  $\beta$  de TCR.

En otra realización, las secuencias extracelulares del dominio constante presentes en el par de polipéptidos de dTCR.

En una realización particular de la invención, las secuencias del dominio variable de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR presentes en el par de polipéptidos de dTCR pueden juntas corresponder al dominio variable funcional de un primer TCR, y las secuencias extracelulares del dominio constante de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR presentes en el par de polipéptidos de dTCR pueden corresponder a las de un segundo TCR, donde los primer y segundo TCR son de la misma especie. Por lo tanto, las secuencias del dominio variable de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en el par de polipéptidos de dTCR pueden corresponder a las de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares del dominio constante de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  pueden corresponder a las de un segundo TCR humano. Por ejemplo, las secuencias extracelulares del dominio constante del sTCR A6 Tax se pueden usar como marco sobre el cual se pueden fusionar los dominios variables  $\alpha$  y  $\beta$  heterólogos.

En otra realización de la invención, las secuencias del dominio variable de las cadenas  $\delta$  y  $\gamma$  de TCR presentes en el par de polipéptidos de dTCR, pueden juntas corresponder al dominio variable funcional de un primer TCR, y las secuencias extracelulares del dominio constante de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR presentes en el par de polipéptidos de dTCR pueden corresponder a las de un segundo TCR, donde el primer y segundo TCR son de la misma especie.



Por lo tanto, las secuencias del dominio variable de las cadenas  $\delta$  y  $\gamma$  presentes en el par de polipéptidos de dTCR pueden corresponder a las de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares del dominio constante de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  pueden corresponder a las de un segundo TCR humano. Por ejemplo, las secuencias extracelulares del dominio constante del sTCR A6 Tax se pueden usar como marco sobre el cual se pueden fusionar los dominios variables  $\gamma$  y  $\delta$  heterólogos.

En una realización particular de la invención, las secuencias del dominio variable de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , o  $\delta$  y  $\gamma$  de TCR presentes en el par de polipéptidos de dTCR, pueden juntas corresponder al dominio variable funcional de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares del dominio constante de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR presentes en el par de polipéptidos de dTCR, pueden corresponder a las de un segundo TCR no humano. Por lo tanto, las secuencias del dominio variable de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , o  $\delta$  y  $\gamma$  presentes en el par de polipéptidos de dTCR pueden corresponder a las de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares del dominio constante de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  pueden corresponder a las de un segundo TCR no humano. Por ejemplo, las secuencias extracelulares del dominio constante de TCR murino se pueden usar como marco sobre el cual se pueden fusionar los dominios variables de TCR  $\alpha$  y  $\beta$  heterólogos humanos.

#### Enlace disulfuro intercatenario

Un elemento característico principal de los dTCR preferidos presentados por partículas fágicas de la presente invención, es un enlace disulfuro entre las secuencias extracelulares del dominio constante del par de polipéptidos de dTCR. Ese enlace corresponde al enlace disulfuro intercatenario nativo presente en los TCR  $\alpha\beta$  diméricos nativos. En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro nativo como no nativo.

La posición del enlace disulfuro está sujeta al requisito de que las secuencias del dominio variable del par de polipéptidos de dTCR o primer y segundo segmentos del polipéptido de scTCR estén mutuamente orientadas sustancialmente como en los receptores de linfocitos T  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  T nativos.

Un enlace disulfuro no nativo se puede formar mutando residuos que no sean de cisteína en el primer y segundo segmentos a cisteína, y provocando la formación del enlace entre los residuos mutados. Se prefieren los residuos cuyos respectivos carbonos  $\beta$  están separados aproximadamente 6 Å (0.6 nm) o menos, y preferentemente en el rango de 3.5 Å (0.35 nm) a 5.9 Å (0.59 nm) en el TCR nativo, de modo que se pueda formar un enlace disulfuro entre residuos de cisteína introducidos en el lugar de los residuos nativos. Se prefiere cuando un enlace disulfuro no nativo está entre residuos en el dominio de inmunoglobulina constante, aunque podría estar entre residuos del dominio proximal a la membrana. Los sitios preferidos donde se pueden introducir cisteínas para formar un enlace disulfuro no nativo son los residuos siguientes en el exón 1 de TRAC\*01 para la cadena  $\alpha$  de TCR y TRBC1\*01 o TRBC2\*01 para la cadena  $\beta$  de TCR:

Cadena $\alpha$ de TCR	Cadena $\beta$ de TCR	Separación nativa de los carbonos $\beta$ (nm)
Thr 48	Ser 57	0.473
Thr 45	Ser 77	0.533
Tyr 10	Ser 17	0.359
Thr 45	Asp 59	0.560
Ser 15	Glu 15	0.59

Los motivos siguientes en las respectivas cadenas de TCR humano se pueden usar para identificar el residuo a mutar (el residuo sombreado es el residuo para la mutación a cisteína).

Thr 48 de la cadena  $\alpha$ : DSDVYITDKTVLDMRSMDFK (aminoácidos 39-58 del exón 1 del gen TRAC\*01) (SEQ ID 1)

Thr 45 de la cadena  $\alpha$ : QSKDSDVYITDKTVLDMRSM (aminoácidos 36-55 del exón 1 del gen TRAC\*01) (SEQ ID 2)

Tyr 10 de la cadena  $\alpha$ : DIQNPDPVYQLRDSKSSDK (aminoácidos 1-20 del exón 1 del gen TRAC\*01) (SEQ ID 3)

Ser 15 de la cadena  $\alpha$ : DPAVYQLRDSKSSDKSVCLF (aminoácidos 6-25 del exón 1 del gen TRAC\*01) (SEQ ID 4)

Ser 57 de la cadena  $\beta$ : NGKEVHSGVSTDPQLKEQP (aminoácidos 48-67 del exón 1 de los genes TRBC1\*01 y TRBC2\*01) (SEQ ID 5)

Ser 77 de la cadena  $\beta$ : ALNDSRYALSSRLRVSAFW (aminoácidos 68-87 del exón 1 de los genes TRBC1\*01 y TRBC2\*01) (SEQ ID 6)

Ser 17 de la cadena  $\beta$ : PPEVAVFEPSEAEISHTQKA (aminoácidos 8-27 del exón 1 de los genes TRBC1\*01 y TRBC2\*01) (SEQ ID 7)

5 Asp 59 de la cadena  $\beta$ : KEVHSGVSTDPQPLKEQPAL (aminoácidos 50-69 del exón 1 de los genes TRBC1\*01 y TRBC2\*01) (SEQ ID 8)

Glu 15 de la cadena  $\beta$ : VFPPEVAVFEPSEAEISHTQ (aminoácidos 6-25 del exón 1 de los genes TRBC1\*01 y TRBC2\*01) (SEQ ID 9)

10 En otras especies, las cadenas de TCR pueden no contar con una región que tenga 100% de identidad con los motivos anteriores. Sin embargo, los técnicos con experiencia serán capaces de utilizar los motivos anteriores para identificar la parte equivalente de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR y por lo tanto el residuo a ser mutado a cisteína. Se pueden utilizar técnicas de alineamiento con este fin. Por ejemplo, se puede usar ClustalW, disponible en el sitio web del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>) para comparar los motivos anteriores con una secuencia particular de una cadena de TCR para localizar la parte pertinente de la secuencia de TCR para la mutación.

20 Se describen scTCR análogos a  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  presentados en partículas proteicas, así como los de otros mamíferos, incluidos, pero no exclusivamente, de ratón, rata, cerdo, cabra y oveja. Como se mencionó antes, los técnicos con experiencia serán capaces de determinar sitios equivalentes a los sitios humanos descritos precedentemente en los cuales se pueden introducir residuos de cisteína para formar un enlace disulfuro intercatenario. Por ejemplo, a continuación se muestran las secuencias de aminoácidos de los dominios solubles C $\alpha$  y C $\beta$  del ratón, junto con motivos que muestran los residuos murinos equivalentes a los residuos humanos mencionados antes, que se pueden mutar a cisteínas para formar un enlace disulfuro intercatenario de TCR (donde los residuos pertinentes están sombreados):

Dominio soluble C $\alpha$  de ratón:

**PYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMK**

**AMDSKSNNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP (SEQ ID 10)**

30

Dominio soluble C $\beta$  de ratón:

**EDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGREV**

**HSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDK**

**WPEGSPKPVTQNISAEAWGRAD (SEQ ID 11)**

35 Equivalente murino de Thr 48 de la cadena  $\alpha$  humana: ESGTFITDKTVLDMKAMDSK (SEQ ID 12)  
 Equivalente murino de Thr 45 de la cadena  $\alpha$  humana: KTMESGTFITDKTVLDMKAM (SEQ ID 13)  
 Equivalente murino de Tyr 10 de la cadena  $\alpha$  humana: YIQNPEPAVYQLKDPRSQDS (SEQ ID 14)  
 Equivalente murino de Ser 15 de la cadena  $\alpha$  humana: AVYQLKDPRSQDSTLCLFTD (SEQ ID 15)  
 Equivalente murino de Ser 57 de la cadena  $\beta$  humana: NGREVHSGVSTDPQAYKESN (SEQ ID 16)  
 Equivalente murino de Ser 77 de la cadena  $\beta$  humana: KESNYSYCLSSRLRVSATFW (SEQ ID 17)  
 Equivalente murino de Ser 17 de la cadena  $\beta$  humana: PPKVSLFEPKAEIANKQKA (SEQ ID 18)  
 40 Equivalente murino de Asp 59 de la cadena  $\beta$  humana: REVHSGVSTDPQAYKESNYS (SEQ ID 19)  
 Equivalente murino de Glu 15 de la cadena  $\beta$  humana: VTPPKVSLFEPKAEIANKQ (SEQ ID 20)

45 Como se señaló anteriormente, los dominios constantes extracelulares de sTCR A6 TAX se pueden utilizar como marco sobre el cual se pueden fusionar dominios variables heterólogos. Se prefiere que las secuencias del dominio variable heterólogo se unan a las secuencias del dominio constante en cualquier punto entre el enlace disulfuro y los extremos N-terminales de las secuencias del dominio constante. En el caso de las secuencias del dominio constante de  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR A6 TAX, el enlace disulfuro se puede formar entre residuos de cisteína introducidos en los residuos de aminoácidos 158 y 172 respectivamente. Por lo tanto, se prefiere si los puntos de unión de la secuencia del dominio variable heterólogo de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  están entre los residuos 159 o 173 y el extremo N terminal de las secuencias del dominio constante de  $\alpha$  o  $\beta$ , respectivamente.

50 Presentación de TCR

55 El método preferido de presentación in vivo de TCR para ciclos de selección por afinidad (biopanning) a fin de identificar los TCR con las propiedades deseables como alta afinidad por un complejo péptido-MHC objetivo, es la presentación en fago.

En primer lugar, se construye una genoteca que codifica una matriz variada de scTCR o dTCR mutados. Esta genoteca se construye usando ADN que codifica un TCR nativo como plantilla para la amplificación. Existen varios métodos adecuados, conocidos por los técnicos con experiencia en el tema, para la introducción de las mutaciones deseadas en el ADN de TCR, y por lo tanto en la proteína de TCR presentada finalmente. Por ejemplo PCR propensa a error (EP-TCR), técnicas de barajado del ADN y uso de cepas bacterianas mutadoras como XL-1-RED son medios convenientes de introducir mutaciones en las secuencias de TCR. Se prefiere particularmente que estas mutaciones se introduzcan en el dominio definido de los TCR. Por ejemplo, las mutaciones en el dominio variable, particularmente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y/o las regiones marco suelen ser los sitios más adecuados para la introducción de las mutaciones que llevan a la producción de una colección variada de TCR para la producción de TCR con mejores propiedades de unión al ligando. EP-PCR es un ejemplo de un método mediante el cual se pueden introducir dichas mutaciones "específicas de la región" en los TCR. Se utilizan cebadores de EP-PCR que son complementarios de las secuencias de ADN que bordean la región a ser mutada, para amplificar múltiples copias de esta región del ADN de TCR que contiene un nivel controlable de mutaciones aleatorias. Estas secuencias de ADN que codifican regiones mutadas se insertan en las secuencias de ADN, las cuales codifican las secciones no mutagenizadas de TCR por ligamiento o PCR de superposición. El ADN que codifica el TCR con región mutada se puede después ligar a ADN que codifica un polipéptido heterólogo para producir una proteína de fusión adecuada para la presentación. En el caso de la presentación en fago el vector de expresión utilizado es un vector fagomídico o de genoma del fago en el cual el ADN de TCR se puede ligar al ADN que codifica una proteína de superficie, preferentemente la proteína de superficie gIII o gVIII. En el caso de un scTCR dicho ligamiento se realiza como para la presentación en fago de cualquier péptido o polipéptido monomérico. En el caso de los dTCR, sólo una de las cadenas de TCR está ligada como se menciona. La otra cadena está codificada en ácido nucleico para la coexpresión con fagómido y ácido nucleico del fago auxiliar, de modo que la segunda cadena expresada se encuentre y se asocie con el fago expresado con la primera cadena presentada en la superficie. En ambos casos, como se discute más detalladamente antes, las cisteínas correctamente posicionadas en los dominios constantes son útiles para hacer que los dominios variables de TCR adopten sus posiciones funcionales, mediante la formación de un enlace disulfuro por esas cisteínas.

Para la expresión, un vector de expresión que comprende: (a) ácido nucleico que codifica una cadena de un par de polipéptidos de dTCR y (b) la otra cadena de un par de polipéptidos de dTCR fusionada a una secuencia de ácido nucleico que codifica una partícula formadora de proteínas, o una proteína de superficie celular; o ácido nucleico que codifica un polipéptido de scTDR fusionado a una secuencia de ácido nucleico que codifica una partícula formadora de proteína o una proteína de superficie celular, el par de polipéptidos de dTCR, o una composición que comprende un primer vector que contiene ácido nucleico (a) y un segundo vector que contiene ácido nucleico (b), se ponen en contacto con las células huésped capaces de causar la expresión del material genético codificado en condiciones adecuadas para permitir la transformación de dichas células. Dichos vectores de expresión, sistemas de expresión que comprenden vectores fagomídicos o de genoma del fago que codifican los dTCR y scTCR, y las células huésped que los albergan, forman aspectos adicionales de la invención actual. En una realización preferida de la invención los vectores fagomídico o de genoma del fago derivan de fagos filamentosos.

Después las células transformadas se incuban para permitir la expresión de las partículas proteicas que presentan TCR. Luego esas partículas se pueden utilizar para cribado o en los ensayos para identificar variantes de TCR con características mejoradas. Todas las partículas en investigación que posean las características específicas mejoradas pueden después ser aisladas. Luego el ADN que codifica estos TCR se puede amplificar por PCR y determinar la secuencia.

Se sabe que altos niveles de expresión de un polipéptido exógeno pueden ser tóxicos para la célula huésped. En tales casos, se debe encontrar una cepa huésped del polipéptido exógeno que sea más tolerante, o los niveles de expresión en la célula huésped se deben limitar a un nivel que sea tolerado. Por ejemplo (Beekwilder et al., (1999) Gene 228 (1 - 2) 23-31) informan que sólo las formas mutadas de un inhibidor de la proteasa de la patata (PI2) que contenía deleciones o codones de parada ámbar sería seleccionada con éxito de una colección de presentación en fago. En el presente caso, una observación en el curso del trabajo informado en los ejemplos de este documento sugiere que puede ser deseable limitar los niveles de expresión de los TCR presentados en partículas proteicas de la invención, al menos en algunas cepas de E. coli. Así, se demostró que el TCR A6 seleccionado en el ejemplo 4 después de rondas repetidas de cultivo derivaba de las células en las que el fagómido había mutado respecto al introducido al principio. La mutación había creado un codón de parada 'ópalos' en la cadena  $\beta$  de TCR. Este codón es 'leído hasta el final' con baja frecuencia por los ribosomas de la cepa de E. coli utilizada, lo que resulta en la inserción de un residuo de triptofano en este sitio y un nivel global más reducido de la expresión de toda la cadena  $\beta$ .

Existen varias estrategias para limitar los niveles de expresión de un polipéptido exógeno a partir de un sistema de expresión dado en un huésped que pueden ser adecuadas para limitar los niveles de expresión de un scTCR, o de una o ambas cadenas de TCR de un dTCR.

Por ejemplo:

Uso de una secuencia promotora débil - El nivel de expresión obtenido para un producto génico determinado, como la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR, se puede adaptar utilizando secuencias promotoras de distinta fuerza. El promotor del fago lambda  $P_{RM}$  es un ejemplo de un promotor débil.

5 Sitios de unión del ribosoma mutado (RBS) - Mutar un solo ácido nucleico en el RBS asociado a un producto génico, como la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR, puede resultar en un menor nivel de expresión. Por ejemplo, mutar una secuencia AGGA de tipo silvestre a AGGG.

10 'Codones de inicio' mutados - Mutar un solo ácido nucleico en el codón de inicio asociado a un producto génico, como la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR, también puede resultar en un menor nivel de expresión. Por ejemplo, mutar un codón de inicio AUG tipo silvestre a GUG.

15 Mutaciones supresoras con pérdida de sentido - Éstas se insertan dentro de las regiones codificantes de la cadena  $\beta$  de TCR. Los ejemplos incluyen el codón de parada 'ópalo' (UGA), este codón de parada 'perforado' produce la inserción de baja frecuencia de un aminoácido triptofano y la lectura hasta el final del resto de la secuencia codificante.

20 Modificación de la fuerza del promotor mediada por metabolito - El nivel de expresión de un producto génico, como la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR, bajo el control de ciertos promotores se puede reducir mediante la adición de un metabolito pertinente a las células que contienen el promotor. Por ejemplo, se pueden utilizar adiciones de glucosa para reducir la expresión de un producto génico bajo el control de un promotor Lac.

25 Utilización de codones - Las células bacterianas y, por ejemplo, las células de mamíferos tienen diferentes 'preferencias' respecto a los codones que usan para codificar ciertos aminoácidos. Por ejemplo, las células bacterianas utilizan comúnmente el codón CGU para codificar arginina mientras que las células eucariotas utilizan comúnmente AGA. Es posible reducir el nivel de expresión de un producto génico, como la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR, utilizando secuencias de ADN que contengan un número de codones menos preferido por el sistema de expresión en uso.

30 Los detalles referentes a los modos precedentes de reducir la expresión del producto génico se pueden encontrar en (Glass (1982) Gene Function - E.coli and its heritable elements, Croom Helm) y (Rezinoff (1980) The Operon 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory).

35 También se sabe que suministrar a cultivos bacterianos una concentración relativamente alta de un azúcar como sacarosa puede aumentar los niveles de expresión en el periplasma de las proteínas solubles. (Véase, por ejemplo (Sawyer et al., (1994) Protein Engineering 7 (11) 1401-1406))

40 Luego de la expresión, el apareamiento correcto de las secuencias del dominio variable del polipéptido de scTCR es asistido preferentemente por la introducción de un enlace disulfuro en el dominio constante extracelular de scTCR. Sin querer quedar limitados por la teoría, se cree que el enlace disulfuro proporciona estabilidad adicional al scTCR durante el proceso de plegamiento y facilita así el apareamiento correcto del primer y segundo segmentos.

45 También como se mencionó antes, para la presentación en fago de dTCR, uno de los polipéptidos del par de dTCR se expresa como si fuese eventualmente a ser presentado como un polipéptido monomérico en el fago, y el otro polipéptido del par de dTCR se coexpresa en la misma célula huésped. Como la partícula fágica se autoensambla, los dos polipéptidos se autoasocian para la presentación como un dímero en el fago. Una vez más, en la realización preferida de este aspecto de la invención, el plegamiento correcto durante la asociación del par de polipéptidos es asistido por un enlace disulfuro entre las secuencias constantes, como hemos comentado previamente. Otros detalles de un procedimiento para la presentación en fago de un dTCR con un enlace disulfuro intercatenario aparecen en los ejemplos de este documento.

50 Como alternativa, el fago que presenta la primera cadena de dTCR se puede expresar primero y la segunda cadena polipeptídica se puede contactar con el fago expresado en un paso posterior para la asociación como un dTCR funcional en la superficie del fago.

55 El método preferido de presentación in vitro de TCR para ciclos de selección por afinidad (biopanning) a fin de identificar los TCR con las propiedades deseables como alta afinidad por un complejo péptido-MHC objetivo, es la presentación en ribosoma. En primer lugar, se construye una genoteca que codifica una matriz variada de polipéptidos de scTCR o dTCR mutados usando las técnicas mencionadas antes. La genoteca se pone en contacto después con ARN polimerasa para producir un banco de ARNm complementario. Opcionalmente, para las técnicas de presentación de ARNm, las secuencias de ARNm se pueden ligar después a una secuencia de ADN que contenga un sitio de unión a puromicina. Luego estos constructos genéticos se ponen en contacto con ribosomas in vitro en las condiciones que permiten la traducción del polipéptido de scTCR o el primer polipéptido del par de dTCR. En el caso de dTCR, el segundo polipéptido del par se expresa por separado y se pone en contacto con el primer

polipéptido presentado en ribosoma para la asociación entre los dos, preferentemente asistida por la formación del enlace disulfuro entre los dominios constantes. Alternativamente, el ARNm que codifica ambas cadenas de TCR se puede poner en contacto con ribosomas in vitro en las condiciones que permitan la traducción de las cadenas de TCR de modo que se forme un ribosoma que presente un dTCR. Luego estos ribosomas que presentan scTCR o dTCR se pueden utilizar para cribado o en ensayos para identificar variantes de TCR con características mejoradas. Todas las partículas en investigación que posean las características específicas mejoradas pueden después ser aisladas. El ARNm que codifica estos TCR se puede convertir luego en las secuencias de ADN complementarias utilizando transcriptasa inversa. Después este ADN se puede amplificar por PCR y determinar la secuencia.

10 Aspectos adicionales

Una partícula fágica que presenta un scTCR o dTCR (que preferentemente está constituido por secuencias constantes y variables correspondientes a secuencias humanas) de la presente invención, se puede proporcionar en forma sustancialmente pura o como una preparación purificada o aislada. Por ejemplo, se puede proporcionar en una forma que esté sustancialmente exenta de otras proteínas.

Una partícula fágica de la presente invención que presente una pluralidad de scTCR o dTCR se puede proporcionar en un complejo polivalente. Por lo tanto, la presente invención proporciona, en un aspecto, un complejo de receptor de linfocitos T (TCR) multivalente, que comprende una partícula fágica que presenta una pluralidad de scTCR o dTCR como se describe en este documento. Cada uno de la pluralidad de dichos scTCR o dTCR es preferentemente idéntico.

En otro aspecto, se describe en este documento un método para la detección de complejos de ligandos de TCR, que comprende:

- a. proporcionar una partícula proteica que presente TCR de la invención actual
- b. poner en contacto el fago que presenta TCR con complejos de ligandos putativos;
- y detectar la unión de la partícula proteica que presenta TCR con los complejos de ligandos putativos.

Los ligandos de TCR adecuados para la identificación por el método anterior incluyen, pero no exclusivamente, los complejos péptido-MHC.

35 Aislamiento de variantes de TCR con características mejoradas

Otro aspecto de la invención es un método para identificar los TCR con una característica específica, donde dicho método comprende someter una colección variada de TCR presentados en partículas fágicas de acuerdo con la invención, a un proceso de selección que selecciona en función de dicha característica, y aislar las partículas fágicas que presentan un TCR con dicha característica, y opcionalmente a un proceso de amplificación para multiplicar las partículas aisladas, y/o a un proceso de cribado que mide dicha característica, identificando esas partículas fágicas que presentan un TCR con la característica deseada y aislando esas partículas fágicas, y opcionalmente a un proceso de amplificación para multiplicar las partículas aisladas.

Luego las secuencias de ADN que codifican los TCR variantes se pueden obtener y amplificar por PCR para permitir la determinación de las secuencias. Las características que se pueden mejorar incluyen, pero no exclusivamente, afinidad de unión al ligando y estabilidad del constructo.

50 Uso en cribado

Las partículas fágicas que presentan TCR de la presente invención son capaces de ser utilizadas en métodos de cribado diseñados para identificar moduladores, incluidos los inhibidores, de la sinapsis inmunitaria celular mediada por TCR.

55 Como saben los técnicos con experiencia en el tema existen varios formatos de ensayo que proporcionan una base adecuada para cribados de la interacción proteína-proteína de este tipo.

Los sistemas de ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada como AlphaScreen™, se basan en el uso de perlas "dadoras" y "ceptoras" recubiertas con una capa de hidrogel a las que se pueden unir proteínas receptores y ligandos. La interacción entre estas moléculas de receptor y ligando aproxima las perlas. Cuando estas perlas se someten a luz láser un fotosensibilizador en la perla "dadora" convierte el oxígeno del ambiente en un estado singlete más excitado. Las moléculas de oxígeno en el estado singlete difunden para reaccionar con un emisor de quimioluminiscencia en la perla "ceptora" que después activa fluoróforos contenidos en la misma perla. A continuación los fluoróforos emiten luz a 520-620 nm, esto indica que se ha producido la interacción receptor-

ligando. La presencia de un inhibidor de la interacción receptor-ligando hace disminuir esta señal.

La resonancia de plasmones superficiales (SPR) es un ensayo óptico de interfaz, en el cual uno de los participantes de la unión (generalmente el receptor) se inmoviliza en un 'chip' (la superficie del sensor) y se detecta la unión del otro participante de la unión (generalmente el ligando) que es soluble y es obligado a extenderse sobre el chip. La unión del ligando resulta en un aumento en la concentración de proteína cerca de la superficie del chip lo que provoca un cambio en el índice de refracción en esa región. La superficie del chip está compuesta de modo tal que el cambio en el índice de refracción puede ser detectado mediante resonancia de plasmones superficiales, un fenómeno óptico por el cual la luz en un determinado ángulo de incidencia sobre una película delgada de metal produce un haz reflejado de menor intensidad debido a la excitación resonante de ondas de oscilación de la densidad superficial de carga (plasmones superficiales). La resonancia es muy sensible a los cambios en el índice de refracción en el extremo más alejado de la película metálica, y es esta señal la que se utiliza para detectar la unión entre las proteínas inmovilizadas y solubles. Se dispone comercialmente de sistemas que permiten el uso conveniente de la detección por SPR de interacciones moleculares, y de análisis de datos. Los ejemplos son los equipos lasys™ (Fisons) y los equipos Biacore™.

Otros ensayos ópticos de interfaz incluyen fluorescencia de reflexión interna total (TIRF), espejo resonante (RM) y un sensor óptico de acoplador de red de difracción (GCS) y se tratan más detalladamente en Woodbury y Venton (J. Chromatog. B. 725 113-137 (1999)).

El ensayo de proximidad de centelleo (SPA) ha sido utilizado para cribar quimiotecas en busca de inhibidores de la interacción de baja afinidad entre CD28 y B7 ( $K_d$  probablemente en la región de 4  $\mu$ M (Van der Merwe et al. J. Exp. Med. 185:393-403 (1997), Jenh et al., Anal Biochem 165(2) 287-93 (1998)). SPA es un ensayo radiactivo que hace uso de la emisión de partículas beta de ciertos isótopos radiactivos que transfieren energía a una sustancia centelleante inmovilizada en la superficie del indicador. El corto alcance de las partículas beta en solución asegura que sólo se produce centelleo cuando las partículas beta se emiten muy próximas a la sustancia centelleante. Cuando se aplica para la detección de interacciones proteína-proteína, una de las partes de la interacción se marca con el radioisótopo, mientras que la otra se une a las perlas que contienen una sustancia centelleante o se aplica sobre una superficie junto con la sustancia centelleante. Si el ensayo se puede configurar óptimamente, el radioisótopo se llevará suficientemente cerca de la sustancia centelleante para que la emisión de fotones se active sólo cuando se produzca la unión entre las dos proteínas.

Otro aspecto descrito en este documento es un método para identificar un inhibidor de la interacción entre una partícula proteica que presenta TCR de la invención y un ligando que se une a TCR, que comprende poner en contacto la partícula proteica que presenta TCR con un ligando que se une a TCR, en presencia y en ausencia de un compuesto de prueba y determinar si la presencia del compuesto de prueba reduce la unión de la partícula proteica que presenta TCR con el ligando que se une a TCR, tomándose dicha reducción como identificadora de un inhibidor.

Otro aspecto descrito es un método para identificar un potencial inhibidor de la interacción entre una partícula proteica que presenta TCR de la invención y un ligando que se une a TCR, por ejemplo un complejo MHC-péptido, que comprende poner en contacto la partícula proteica que presenta TCR, o la parte ligando que se une a TCR, con un compuesto de prueba y determinar si el compuesto de prueba se une a la partícula proteica que presenta TCR y/o el ligando que se une a TCR, tomándose dicha unión como identificadora de un potencial inhibidor. Este aspecto de la invención puede encontrar utilidad particular en ensayos ópticos de interfaz como los llevados a cabo utilizando el sistema Biacore™.

TCR de alta afinidad

La presente invención también torna disponibles TCR mutados específicos para un ligando de TCR determinado con mayor afinidad por dicho ligando de TCR que el TCR de tipo silvestre. Se espera que estos TCR de alta afinidad sean particularmente útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Según se usa en el presente documento la expresión 'TCR de alta afinidad' se refiere a un scTCR o dTCR mutado que interacciona con un ligando de TCR específico y: o bien tiene una  $K_d$  para dicho ligando de TCR inferior a la de un TCR nativo correspondiente según se mide por resonancia de plasmones superficiales, o bien tiene una constante de disociación ( $k_{off}$ ) para dicho ligando de TCR inferior a la de un TCR nativo correspondiente, según se mide por resonancia de plasmones superficiales.

Los scTCR o dTCR de alta afinidad de la presente invención están preferentemente mutados respecto a los TCR nativos en al menos una región determinante de complementariedad y/o regiones marco.

El ligando de TCR para el cual un TCR de alta afinidad determinado es específico puede ser un complejo péptido-MHC (pMHC).

El ligando de TCR para el cual un TCR de alta afinidad determinado es específico puede ser un tipo o tipos de MHC.

El ligando de TCR para el cual un TCR de alta afinidad determinado es específico puede ser el complejo HLA-A2 péptido tax (LLFGYPVYV) (SEQ ID 21).

5 El ligando de TCR para el cual un TCR de alta afinidad determinado es específico puede ser el complejo HLA-A2 péptido NY-ESO (SLLMITQC) (SEQ ID 22).

10 Un scTCR de alta afinidad o una o ambas de las cadenas de dTCR de alta afinidad se pueden marcar con un compuesto para imagenología, por ejemplo, un marcador que sea adecuado para diagnóstico. Dichos TCR de alta afinidad marcados son útiles en un método para detectar un ligando de TCR seleccionado entre complejos CD1-antígeno, superantígenos bacterianos y complejos MHC-péptido/superantígeno donde dicho método comprende poner en contacto el ligando de TCR con un TCR de alta afinidad (o un complejo de TCR de alta afinidad multimérico) que sea específico para el ligando de TCR; y detectar la unión al ligando de TCR. En los complejos de TCR de alta afinidad tetraméricos (formados, por ejemplo, utilizando heterodímeros biotinilados) se puede utilizar estreptavidina fluorescente (disponible comercialmente) para proporcionar un marcador detectable. Un tetrámero marcado con fluorescencia es adecuado para usar en análisis FACS, por ejemplo para detectar células presentadoras de antígeno que acarrean el péptido para el cual el TCR de alta afinidad es específico.

20 Otra manera en la cual se pueden detectar los TCR de alta afinidad solubles descritos aquí es mediante el uso de anticuerpos específicos para TCR, en particular anticuerpos monoclonales. Hay muchos anticuerpos anti-TCR disponibles comercialmente, como  $\alpha$ FI y  $\beta$ FI, que reconocen los dominios constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente.

25 Un TCR de alta afinidad (o complejo multivalente de éste) descrito aquí se puede asociar alternativa o adicionalmente (por ej. covalentemente o unido de otra manera) a un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, un grupo tóxico para provocar la muerte de células, o un agente inmunoestimulante como una interleucina o una citocina. Un complejo multivalente de TCR de alta afinidad puede tener mayor capacidad de unión para un ligando de TCR en comparación con un receptor de linfocitos T no-multimérico tipo silvestre o heterodímero de alta afinidad. Por lo tanto, los complejos multivalentes de TCR de alta afinidad son particularmente útiles para seguir o señalar células que presentan antígenos particulares in vitro o in vivo y también son útiles como productos intermedios para la producción de más complejos multivalentes de TCR de alta afinidad que tienen dichos usos. El TCR de alta afinidad o complejo de TCR multivalente de alta afinidad, se pueden proporcionar, por lo tanto, en una formulación farmacéuticamente aceptable para usar in vivo.

35 Se describe un método para administrar un agente terapéutico a una célula diana, donde el método comprende poner en contacto posibles células diana con un TCR de alta afinidad o complejo multivalente de TCR de alta afinidad en condiciones para permitir la unión de TCR de alta afinidad o complejo multivalente de TCR de alta afinidad con la célula diana, donde dicho TCR de alta afinidad o complejo multivalente de TCR de alta afinidad es específico para el ligando de TCR y tiene el agente terapéutico asociado.

40 En particular, el TCR de alta afinidad soluble o complejo multivalente de TCR de alta afinidad se puede utilizar para administrar agentes terapéuticos a la ubicación de células presentadoras de un antígeno particular. Esto sería útil en muchas situaciones y, en particular, contra tumores. Un agente terapéutico podría ser administrado de modo que ejerciera su efecto localmente pero no sólo en la célula a la que se une. Por lo tanto, una estrategia particular prevé moléculas antitumorales unidas a receptores de linfocitos T de alta afinidad o complejos multivalentes de TCR de alta afinidad específicos para los antígenos tumorales.

50 Muchos agentes terapéuticos se podrían emplear para este uso, por ejemplo compuestos radiactivos, enzimas (por ejemplo perforina) o agentes antineoplásicos (por ejemplo cisplatino). Para asegurar que los efectos tóxicos son ejercidos en la ubicación deseada la toxina podría estar dentro de un liposoma unida a la estreptavidina de modo que el compuesto se libere lentamente. Esto evitará efectos perjudiciales durante el transporte en el organismo y asegurará que la toxina tiene un efecto máximo después de la unión de TCR a las células presentadoras de antígeno pertinentes.

55 Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- agentes citotóxicos de molécula pequeña, es decir, compuestos con la capacidad para destruir células de mamíferos con un peso molecular menor de 700 Dalton. Dichos compuestos también podrían contener metales tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, se debe entender que estos agentes citotóxicos de molécula pequeña también incluyen profármacos, es decir, compuestos que se descomponen o se convierten en condiciones fisiológicas para liberar agentes citotóxicos. Los ejemplos de tales agentes incluyen cisplatino, derivados de maitansina, raquelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, porfímero sódico photofrin II, temozolmida, topotecán, trimetreato

- glucuronato, auristatina E vincristina y doxorubicina;
- citotoxinas peptídicas, es decir proteínas o sus fragmentos con capacidad para destruir células de mamíferos. Los ejemplos incluyen ricina, toxina diftérica, exotoxina A bacteriana de pseudomonas, ADNasa y ARNasa; radionúclidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se descomponen con la emisión simultánea de una o más de las partículas  $\alpha$  o  $\beta$ , o rayos  $\gamma$ . Los ejemplos incluyen yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astato 213; se pueden utilizar agentes quelantes para facilitar la asociación de estos radionúclidos a los TCR de la alta afinidad, o sus multímeros;
- profármacos, como profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpo;
- inmunostimulantes, es decir, grupos que estimulan la respuesta inmunitaria. Los ejemplos incluyen citocinas como IL-2, quimiocinas como IL-8, factor plaquetario 4, proteína que estimula el crecimiento del melanoma, etc., los anticuerpos o fragmentos de éstos, activadores de complemento, dominios de proteínas xenogéneas, dominios de proteínas alogéneas, dominios de proteínas virales/bacterianas y péptidos virales/bacterianos.

Los TCR de alta afinidad solubles o complejos multivalentes de TCR de alta afinidad se pueden unir con una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco. Esto permite que el profármaco se convierta en el fármaco sólo en el sitio donde es necesario (es decir, dirigido por el sTCR).

Una multitud de tratamientos de enfermedades pueden potencialmente ser mejorados localizando el fármaco a través de la especificidad de los TCR de alta afinidad solubles. Por ejemplo, se espera que los TCR A6 de alta afinidad específicos para HLA-A2-tax (LLFGYPVYV) (SEQ ID 21) dados a conocer en este documento se puedan usar en métodos para el diagnóstico y tratamiento de HTLV-1 y que los TCR NY-ESO de alta afinidad específico para HLA-A2-NY-ESO (SLLMITQC) (SEQ ID 22) dados a conocer en este documento se puedan usar en métodos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Las enfermedades virales para que cuales existen fármacos, por ejemplo VIH, VIS, VEB, CMV, se beneficiarían de la liberación o la activación del fármaco en las proximidades de las células infectadas. Para el cáncer, la localización en las cercanías de los tumores o las metástasis aumentaría el efecto de las toxinas o inmunostimulantes. En las enfermedades autoinmunitarias, los fármacos inmunosupresores podrían liberarse lentamente, con más efecto local durante un período más largo mientras afectan mínimamente la inmunocapacidad total del sujeto. En la prevención del rechazo del injerto, el efecto de los fármacos inmunosupresores se podría optimizar de la misma manera. Para la administración de vacunas, el antígeno de la vacuna se podría localizar en las proximidades de las células presentadoras de antígeno, aumentando así la eficacia del antígeno. El método también se puede aplicar con fines de imagenología.

Los TCR de alta afinidad solubles se pueden utilizar para modular la activación de los linfocitos T uniéndose al ligando específico de TCR e inhibiendo así la activación de linfocitos T. Las enfermedades autoinmunitarias que implican inflamación y/o daño de tejidos mediados por linfocitos T podrían evitarse a este enfoque, por ejemplo la diabetes tipo I. Es necesario el conocimiento del epítipo peptídico específico presentado por el pMHC pertinente para este uso.

Los TCR de alta afinidad terapéuticos o para imagenología generalmente se suministrarán como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada, (dependiendo del método deseado de administración al paciente). Se puede suministrar como una forma farmacéutica unitaria, generalmente se proporcionarán en un envase sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Dicho kit normalmente (aunque no necesariamente) incluirá indicaciones de uso. Puede incluir varias de dichas formas farmacéuticas unitarias.

La composición farmacéutica se puede adaptar para la administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo parenteral, transdérmica o por inhalación, preferentemente por vía parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular o, más preferentemente intravenosa). Dichas composiciones se pueden preparar por cualquier método conocido en el área de la farmacia, por ejemplo mezclando el principio activo con el portador o portadores o el excipiente o excipientes en condiciones estériles.

Las dosis de las sustancias de la presente invención pueden variar entre límites amplios, dependiendo de la enfermedad o el trastorno a tratar, la edad y la afección del individuo a ser tratado, etc. y un médico determinará en última instancia las dosis de uso adecuadas.

En este documento se describe un método para obtener una cadena de TCR de alta afinidad, donde el método comprende incubar una célula huésped en condiciones que causan la expresión de la cadena de TCR de alta afinidad y luego purificar el polipéptido.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos mutatis mutandis. Los documentos del estado anterior de la técnica mencionados en este documento están incorporados en la mayor medida permitida por la ley.



**Ejemplos**

La invención se describe aún más en los ejemplos siguientes, que no limitan el alcance de la invención en modo alguno.

5 En lo que sigue se hace referencia a las figuras adjuntas en las cuales:

10 Las figuras 1a y 1b muestran, respectivamente, las secuencias de ácido nucleico de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un TCR A6 soluble, mutado con el fin de introducir un codón de cisteína. El sombreado indica los codones de cisteína introducidos.

15 La figura 2a muestra la secuencia extracelular de aminoácidos de la cadena  $\alpha$  de TCR A6, que incluye la mutación  $T_{48} \rightarrow C$  (subrayada) utilizada para producir el nuevo enlace disulfuro intercatenario, y la figura 2b muestra la secuencia extracelular de aminoácidos de la cadena  $\beta$  de TCR A6, que incluye la mutación  $S_{57} \rightarrow C$  (subrayada) utilizada para producir el nuevo enlace disulfuro intercatenario.

20 La figura 3 describe la clonación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR en vectores fagomídicos. El diagrama describe un vector de presentación en fago. RSB es el sitio de unión del ribosoma. S1 o S2 son péptidos señal para la secreción de proteínas en el periplasma de *E. coli*. El \* indica traducción del codón de parada. Cualquiera de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR se puede fusionar a la proteína de la cápside del fago, sin embargo en este diagrama sólo la cadena  $\beta$  de TCR se fusiona a la proteína de la cápside del fago.

La figura 4 detalla la secuencia de ADN del fagómido pEX746:A6.

25 La figura 5 es la expresión de fusiones de partículas fágicas de proteína de la cubierta bacteriana y A6 TCR heterodimérico en *E. coli*. Las proteínas de fusión de TCR A6 heterodimérico:gIII se detectan con inmunotransferencia tipo western. Las partículas fágicas se preparan a partir de *E. coli* XL-1-Blue y se concentran con PEG/NaCl. Las muestras se cargan en tampones de muestra reductores o no reductores. El carril 1 es la muestra del clon 7 que contiene la secuencia correcta y el carril 2 es la muestra del clon 14 que contiene una delección en el gen que codifica la cadena  $\alpha$ . Se detectó la proteína de fusión TCR A6 heterodimérico:gIII a 125 kDa.

35 La figura 6 ilustra la detección por ELISA de la actividad de unión del complejo pMHC péptido de un TCR A6 heterodimérico presentado en fago. El clon 7 se une específicamente al complejo HLA A2-Tax. El clon 14 no se puede unir a ningún pMHC, puesto que ningún TCR está unido a las partículas fágicas.

La figura 7a es una ilustración esquemática del constructo de presentación en ribosoma del ADN de A6 TCR-C-Kappa de una sola cadena.

40 Las figuras 7b y 7c detallan la hebra codificante completa del ADN y la secuencia de aminoácidos del constructo de presentación en ribosoma del ADN de A6 TCR-C-Kappa de una sola cadena codificado en pUC19, respectivamente.

La figura 8 detalla la secuencia de ADN de pUC19-T7.

45 La figura 9 detalla la secuencia de ADN del constructo de presentación en ribosoma de TCR A6-C-Kappa de una sola cadena que se clonó en pUC19-T7.

La figura 10 es una inmunotransferencia tipo western que muestra la detección de A6 TCR-C-Kappa de una sola cadena traducido in vitro usando lisados de reticulocitos de conejo Ambion.

50 La figura 11 es una RT-PCR del ARNm de A6 TCR-C-Kappa de una sola cadena en perlas recuperadas de las reacciones de presentación en ribosoma.

55 La figura 12a detalla la secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  de TCR A6 clon 9 mutado; el ácido nucleico mutado se indica en negrita.

La figura 12b detalla la secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta$  de TCR A6 clon 9 mutado, la posición correspondiente al codón de parada ópalo introducido se indica con un \*.

60 La figura 13 detalla la secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  de TCR A6 clon 49 mutado; el ácido nucleico mutado se indica en negrita. Como se trata de una mutación 'silenciosa' no se introduce ningún cambio en la secuencia de aminoácidos resultante mediante esta mutación.

La figura 14a detalla la secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  de TCR A6 de TCR A6 clon 134 mutado; los ácidos nucleicos mutados se indican en negrita.

La figura 14b detalla la secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta$  de TCR A6 de TCR A6 clon 134 mutado, analizado por ensayo BIAcore; los aminoácidos mutados se indican en negrita.

5 La figura 14c detalla la secuencia de aminoácidos de la cadena A6 TCR  $\beta$  de TCR A6 clon 134 mutado, analizado por ensayo fago-ELISA; los aminoácidos mutados se indican en negrita.

La figura 15 son datos BIAcore para la unión del clon 134 de TCR A6 con HLA-A2 Tax y HLA-A2 NY-ESO

10 La figura 16 son datos BIAcore utilizados para determinar  $T_{OFF}$  para la unión del clon 134 de TCR A6 con HLA-A2 Tax

Las figuras 17a y 17b muestran la secuencia de ADN de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  mutadas de TCR NY-ESO, respectivamente

15 Las figuras 18a y 18b muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  mutadas de TCR NY-ESO, respectivamente

20 Las figuras 19a y 19b detallan la secuencia de DNA y de aminoácidos de la cadena  $\beta$  de TCR NY-ESO incorporada en el fagómido pEX746:NY-ESO, respectivamente.

La figura 20 muestra la unión específica de las partículas fágicas que presentan TCR NY-ESO con HLA-A2-NY-ESO en un ensayo fago-ELISA.

25 La figura 21 muestra la secuencia de ADN de la cadena DR1 $\alpha$  que incorpora codones que codifican el péptido de dimerización de Fos unido al extremo 3' de la secuencia DRA0101. El sombreado indica los codones de Fos y los codones marcadores de biotinilación se indican en negrita.

30 La figura 22 muestra la secuencia de ADN del vector bicistrónico pAcAB3 utilizado para la expresión de complejos HLA-péptido de clase II en células de insecto Sf9. El sitio de restricción Bgl II (AGATCT) utilizado para insertar la cadena  $\alpha$  de HLA y el sitio de restricción BamHI (GGATCC) utilizado para insertar la cadena  $\beta$  de HLA se indican mediante sombreado.

35 La figura 23 muestra la secuencia de ADN de la cadena DR1 $\beta$  que incorpora codones que codifican el péptido de dimerización de Jun unido al extremo 3' de la secuencia DRB0401 y codones que codifican un péptido cargado en HLA unido al extremo 5' de la secuencia DRB0401. El sombreado indica los codones de Jun, y los codones del péptido HA de la gripe cargado en HLA están subrayados.

40 La figura 24 muestra una huella BIAcore de la unión de TCR A6 clon 134 de alta afinidad a celdas de flujo recubiertas de la manera siguiente:

Celda de flujo 1 (FC 1) - blanco  
 Celda de flujo 2 (FC 2) - HLA-A2 (LLGRNSFEV) (SEQ ID 23)  
 Celda de flujo 3 (FC 3) - HLA-A2 (KLVALGINAV) (SEQ ID 24)  
 Celda de flujo 4 (FC 4) - HLA-A2 (LLGDLFV) (SEQ ID 25)

45 La figura 25 muestra una huella BIAcore de la unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad a celdas de flujo recubiertas de la manera siguiente:

Celda de flujo 1 (FC 1) - blanco  
 Celda de flujo 2 (FC 2) - HLA-B8 (FLRGRAYGL) (SEQ ID. 26)  
 Celda de flujo 3 (FC 3) - HLA-B27 (HRCQAIRKK) (SEQ ID 27)  
 Celda de flujo 4 (FC 4) - HLA-Cw6 (YRSGIIVV) (SEQ ID 28)

50 La figura 26 muestra una huella BIAcore de la unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad a celdas de flujo recubiertas de la manera siguiente:

Celda de flujo 1 (FC 1) - blanco  
 Celda de flujo 2 (FC 2) - HLA-A24 (VYGFVRACL) (SEQ ID 29)  
 Celda de flujo 3 (FC 3) - HLA-A2 (ILAKFLHWL) (SEQ ID 30)  
 Celda de flujo 4 (FC 4) - HLA-A2 (LTLGEFLKL) (SEQ ID 31)

60 La figura 27 muestra una huella BIAcore de la unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad a celdas de flujo recubiertas de la manera siguiente:

Celda de flujo 1 (FC 1) - blanco  
 Celda de flujo 2 (FC 2) - HLA-DR1 (PKYVKQNTLKLA) (SEQ ID 32)  
 Celda de flujo (FC 3) 3 - HLA-A2 (GILGFVFTL) (SEQ ID 33)  
 Celda de flujo 4 (FC 4) - HLA-A2 (SLYNTVATL) (SEQ ID 34)

5 La figura 28 muestra una huella BIACore de la unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad a celdas de flujo recubiertas de la manera siguiente:

10 Celda de flujo 1 (FC 1) - blanco  
 Celda de flujo 4 (FC 4) - HLA-A2 (LLFGYPVYV) (SEQ ID 21)

Las figuras 29a y 29b muestran gráficos Biacore de la interacción entre TCR NY-ESO de alta afinidad soluble y HLA-A2 NY-ESO.

15 Las figuras 30a y 30b muestran gráficos Biacore de la interacción entre TCR NY-ESO de "tipo silvestre" soluble y HLA-A2 NY-ESO.

Las figuras 31a y 31b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 mutante soluble (clon 1) y HLA-A2 Tax.

20 Las figuras 32a y 32b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 mutante soluble (clon 111) y HLA-A2 Tax.

25 Las figuras 33a y 33b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 mutante soluble (clon 89) y HLA-A2 Tax.

La figura 34 muestra un gráfico Biacore de la interacción entre un TCR A6 mutante soluble (que contiene las mutaciones del clon 71 y el clon 134) y HLA-A2 Tax.

30 La figura 35 muestra un gráfico Biacore de la interacción entre un TCR A6 mutante soluble (que contiene las mutaciones del clon 1 y  $\beta$ G102→A) y HLA-A2 Tax.

Las figuras 36a y 36c muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 mutante soluble (que contiene las mutaciones del clon 89 y el clon 134) y HLA-A2 Tax.

35 Las figuras 37a y 37b muestran gráficos Biacore de la interacción entre un TCR A6 mutante soluble (que contiene mutaciones del clon 71 y el clon 89) y HLA-A2 Tax.

40 La figura 38 detalla las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena  $\beta$  de los clones de TCR A6 siguientes:

38A - tipo silvestre, 38b - clon 134, 38c - clon 89, 38d - clon 1 y 38e - clon 111

45 Los residuos mutados se muestran en negrita, los residuos entre corchetes son residuos alternativos que pueden estar presentes en un sitio particular.

Figuras 39A y 39B I

50 Ejemplo 1 - Diseño de cebadores y mutagénesis de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR A6 Tax para introducir los residuos de cisteína necesarios para la formación de un nuevo enlace disulfuro intercatenario

Para mutar la treonina 48 de A6 Tax del exón 1 en TRAC\* 01 a cisteína, se diseñaron los cebadores siguientes (la mutación se muestra en minúsculas):

55 5'-C ACA GAC AAA **tg**T GTG CTA GAC AT (SEQ ID 35)  
 5'-AT GTC TAG CAC **Aca** TTT GTC TGT G (SEQ ID 36)

Para mutar la serina 57 de A6 Tax del exón 1 en TRBC1\*01 y TRBC2\*01 a cisteína, se diseñaron los cebadores siguientes (la mutación se muestra en minúsculas):

60 5'-C AGT GGG GTC **tGC** ACA GAC CC (SEQ ID 37)  
 5'-GG GTC TGT **Gca** GAC CCC ACT G (SEQ ID 38)

Mutagénesis por PCR:

Los plásmidos de expresión que contienen los genes para las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR A6 Tax se mutaron utilizando los cebadores de la cadena  $\alpha$  o los cebadores de la cadena  $\beta$ , respectivamente, de la manera siguiente. 100 ng de plásmido se mezclaron con 5  $\mu$ l de dNTP 10 mM, 25  $\mu$ l de tampón 10 x Pfu (Stratagene), 10 unidades de polimerasa Pfu (Stratagene) y el volumen final se ajustó a 240  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O. 48  $\mu$ l de esta mezcla se complementaron con cebadores diluidos para dar una concentración final de 0.2  $\mu$ M en 50  $\mu$ l de volumen de reacción final. Después de un paso de desnaturalización inicial de 30 segundos a 95 °C, la mezcla de reacción se sometió a 15 rondas de desnaturalización (95 °C, 30 s), apareamiento (55 °C, 60 s) y elongación (73 °C, 8 min.) en un equipo de PCR Hybaid PCR express. Después el producto se digirió durante 5 horas a 37 °C con 10 unidades de enzima de restricción DpnI (New England Biolabs). 10  $\mu$ l de la reacción digerida se transformaron en bacterias XL1-Blue competentes y se cultivaron durante 18 horas a 37 °C. Se picó una sola colonia y se cultivó durante la noche en 5 ml de TYP + ampicilina (16 g/l de Bacto-triptona, 16 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 2.5 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg/l de ampicilina). El ADN plasmídico se purificó en una columna mini-prep de Qiagen según las instrucciones del fabricante y la secuencia se verificó mediante secuenciación automatizada en el centro de secuenciación del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford. Se muestran las respectivas secuencias mutadas de ácido nucleico y aminoácidos en las figuras 1a y 2a para la cadena  $\alpha$ , y en las figuras 1b y 2b para la cadena  $\beta$ .

Ejemplo 2 - Construcción de vectores de presentación en fago y clonación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR A6 en los vectores fagomídicos.

Con el fin de presentar un TCR A6 heterodimérico que contiene un enlace disulfuro intercatenario no nativo en partículas de fago filamentosos, se construyeron vectores fagomídicos para la expresión de proteínas de fusión que comprenden el TCR A6 heterodimérico que contiene un enlace disulfuro intercatenario no nativo, con una proteína de la cápside del fago. Estos vectores contienen un origen pUC19, un origen M13, un gen bla (resistente a la ampicilina), el promotor/operador Lac y un sitio de unión a CAP. El diseño de estos vectores se representa en la figura 3, que describe vectores que codifican las proteínas de fusión cadena  $\beta$  de TCR A6-gp3 o cadena  $\beta$  de TCR A6-gp8 además de la cadena  $\alpha$  de TCR A6 soluble. Los vectores de expresión que contienen las secuencias de ADN de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  mutadas de TCR A6 que incorporan los residuos de cisteína adicionales necesarios para la formación de un enlace disulfuro intercatenario preparados en el ejemplo 1 y como se muestra en la figuras 1a y 1b, se utilizaron como fuente de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR A6 para la producción de un fagómido que codifica este TCR. Se da la secuencia de ADN completa del constructo fagomídico (pEX746) utilizado en la figura 4.

Los métodos de clonación molecular para la construcción de los vectores se describen en "Molecular cloning: A laboratory manual, por J. Sambrook y D. W. Russell".

Los cebadores enumerados en la tabla 1 se utilizan para la construcción de los vectores. Un ejemplo del programa de PCR es 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 5 segundos, 53 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 90 segundos, seguido de 1 ciclo de 72 °C durante 10 minutos y luego mantenido a 4 °C. La ADN polimerasa Taq de alta fidelidad para expansión se adquirió a Roche.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la construcción de los vectores de presentación en fago de TCR A6

Nombre del cebador	Secuencia, 5' a 3'
YOL1	TAATAATACGTATAATAATATTCTATTTCAAG GAGACAGTC (SEQ ID 39)
YOL2	CAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAGGTATT TCATTATGACTGTCTCCTTCAAATAG (SEQ ID 40)
YOL3	CtaCGGCAGCCGCTGGATTGTTACTACTCGCG GCCAGCCGCCATGGCCcag (SEQ ID 41)
YOL4	GTTCTGCTCCACTTCCTTCTGGGCCATGGCCG GCTGGGCCG (SEQ ID 42)
YOL5	CAGAAGGAAGTGGAGCAGAAC (SEQ ID 43)

ES 2 451 691 T3

Nombre del cebador	Secuencia, 5' a 3'
YOL6	CTTCTTAAAGAATTCTTAATTAACCTAGGTTA TTAGGAACCTTTCTGGGCTGGGAAG (SEQ ID 44)
YOL7	GTTAATTAAGAATTCTTTAAGAAGGAGATATA CATATGAAAAAATTATTATTCGCAATTC (SEQ ID 45)
YOL8	CGCGCTGTGAGAATAGAAAGGAACAATAAAG GAATTGCGAATAATAATTTTTTCATATG (SEQ ID 46)
YOL9	CTTTCTATTCTCACAGCGCGCAGGCTGGTGTC ACTCAGAC (SEQ ID 47)
YOL10	
YOL11	GCATCTAGACATCATCACCATCATCACTAGAC TGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAAC (SEQ ID 49)
YOL12	CTAGAGGGTACCTTATTAAGACTCCTTATTAC GCAGTATG (SEQ ID 50)

Ejemplo 3 - Expresión de fusiones de proteína de la cápside bacteriana y TCR A6 heterodimérico en E. coli.

5 Con el fin de validar el constructo hecho en el ejemplo 2, las partículas fágicas que presentan el TCR A6 heterodimérico que contiene un enlace disulfuro intercatenario no nativo se prepararon usando los métodos descritos previamente para la generación de partículas fágicas que presentan el anticuerpo scFvs (Li et al., 2000, Journal of Immunological Methods 236: 133-146) con las modificaciones siguientes. Las células de E. coli XL-1-Blue que contienen el fagómido pEX746:A6 (es decir, el fagómido que codifica la cadena  $\alpha$  de TCR A6 soluble y una cadena  $\beta$  de TCR A6 fusionada a la proteína gIII del fago producida como se describe en el ejemplo 2) se usaron para inocular 5 ml de Lbatg (caldo L de Lennox con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina, 12.5  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina y 2% de glucosa), y luego el cultivo se incubó con agitación a 37 °C durante la noche (16 horas). Se usaron 50  $\mu\text{l}$  del cultivo de toda la noche para inocular 5 ml de TYPatg (TYP es 16 g/l de peptona, 16 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y 2.5 g/l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), y después el cultivo se incubó con agitación a 37 °C hasta  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.8$ . Se agregó el fago auxiliar M13 K07 al cultivo hasta la concentración final de  $5 \times 10^9$  ufp/ml. Después el cultivo se incubó a 37 °C de forma estacionaria durante 30 minutos y luego con agitación a 200 rpm durante otros 30 minutos. Después el medio del cultivo anterior se cambió a TYPak (TYP con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina, 25  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina), luego el cultivo se incubó a 25 °C con agitación a 250 rpm por 36 a 48 horas. A continuación el cultivo se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 4 °C para la concentración o el análisis posterior.

20 La proteína de fusión de una proteína de la cápside filamentosa y TCR A6 heterodimérico que contiene un enlace disulfuro intercatenario no nativo, se detectó en el sobrenadante por inmunotransferencia tipo western. Aproximadamente  $10^{11}$  ufc de partículas fágicas se cargaron en cada carril de un gel de SDS-PAGE tanto en tampón de carga reductor como no reductor. Las proteínas separadas se sondaron con un anticuerpo primario, con un mAb anti-gIII de M13, seguido de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Después se

detectó la actividad de HRP con el kit de sustrato Opti-4CN de Bio-Rad (Figura 5). Estos datos indicaron que TCR A6 enlazado por disulfuro del clon 1 se fusiona a una proteína de la cápside del fago filamentoso, proteína gIII.

5 Ejemplo 4 - Detección de TCR A6 heterodimérico funcional que contiene un enlace disulfuro intercatenario no nativo en partículas de fago filamentoso

Se detectó la presencia de TCR A6 funcional (unión HLA-A2-tax) presentado en las partículas del fago usando un método fago-ELISA.

10 TCR-Fago ELISA

15 La unión de las partículas fágicas que presentan TCR A6 con péptido-MHC inmovilizado en ELISA se detecta con los antisueros anti-fd primarios de conejo (Sigma) seguidos de mAb anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Sigma). Los sitios de unión de proteínas no específicos de las placas se pueden bloquear con 2% de MPBS o 3% de BSA-PBS

Materiales y reactivos

- 20 1. Tampón de recubrimiento, PBS
2. PBS: NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM
3. MPBS, 3% de marvel-PBS
- 25 4. PBS-Tween: PBS, 0.1% de Tween-20
5. Solución de sustrato, Sigma FAST pNPP, N° de catálogo N2770

Método

- 30 1. Enjuague los pocillos recubiertos con NeutrAvidina dos veces con PBS.
2. Agregue 25 µl de biotina-HLA-A2 Tax o biotina-HLA-A2 NYESO en PBS a una concentración de 10 µg/ml e incube a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos.
- 35 3. Enjuague los pocillos dos veces con PBS
4. Agregue 300 µl del 3% de Marvel-PBS e incube a temperatura ambiente durante 1 hora. Mezcle la suspensión de TCR-fago con 1 volumen de 3% de Marvel-PBS e incube a temperatura ambiente.
- 40 5. Enjuague los pocillos dos veces con PBS
6. Agregue 25 µl de la mezcla de fago-TCR A6/Marvel-PBS, incube en hielo durante 1 hora
- 45 7. Enjuague los pocillos tres veces con PBS-tween helado y tres veces con PBS helado.
8. Agregue 25 µl de anticuerpo anti-fd de conejo helado diluido 1: 1000 en Marvel-PBS e incube en hielo durante 1 hora
- 50 9. Enjuague los pocillos tres veces con PBS-tween helado y tres veces con PBS helado.
10. Agregue 25 µl de mAb anti-conejo conjugado con Ap helado diluido 1: 50 000 en Marvel-PBS e incube en hielo durante 1 hora
- 55 11. Enjuague los pocillos tres veces con PBS-tween helado y tres veces con PBS helado.
12. Agregue 150 µl de fosfatasa alcalina amarilla a cada pocillo y lea la señal a 405 nm

60 Los resultados que se muestran en la figura 6 indican que el clon 1 produjo una partícula fágica que presenta un TCR A6 que se puede unir específicamente a su pMHC análogo. (HLA-A2 Tax)

El análisis de la secuencia de ADN de este TCR A6 presentado reveló la presencia de un codón de parada 'ópalo' en la cadena β de TCR que no está presente en la secuencia correspondiente del constructo del vector de expresión del ejemplo 2. Este codón es 'leído hasta el final' con baja frecuencia por los ribosomas de la cepa de E. coli utilizada, lo que resulta en la inserción de un residuo de triptofano en este sitio y un nivel global más reducido de la

expresión de toda la cadena  $\beta$ . De esta observación se infirió que sólo las células que expresan esta secuencia mutada de TCR A6 habían sobrevivido a las rondas de cultivo del ejemplo 3, y que por lo tanto, los altos niveles de TCR A6 que se había predicho que se iban a expresar mediante el vector de expresión original fueron tóxicas para las células huésped.

#### 5 Ejemplo 5 - Presentación en ribosoma de TCR de una sola cadena (scTCR)

Construcción de vectores scTCR de presentación en ribosoma para usar en la generación de plantillas de PCR para presentación en ribosoma.

10 Se clonaron los constructos para presentación en ribosoma en el plásmido de ADN fácilmente disponible pUC19, para generar una plantilla de ADN para PCR sin error y estable a partir de la cual llevar a cabo experimentos posteriores de presentación en ribosoma. La construcción de vectores se realizó en dos pasos con el fin de evitar el uso de cebadores de oligonucleótidos grandes (con sus problemas de error asociados). El constructo de ADN final de presentación en ribosoma A6 scTCR-C-Kappa se muestra en forma esquemática en la figura 7a y las secuencias de ADN y de la proteína se muestran en la figura 7b. Este constructo se puede escindir de pUC19 como una doble digestión Pst1/EcoR1.

20 Los métodos de clonación molecular para la construcción de los vectores se describen en "Molecular cloning: A laboratory manual, por J. Sambrook y D. W. Russell". Los cebadores enumerados en la tabla 2 se utilizan para la construcción de los vectores. El programa de PCR se utilizó como sigue: 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 120 segundos, seguido de 1 ciclo de 72 °C durante 5 minutos y luego mantenido a 4 °C. La ADN polimerasa Pfu es de Stratagene. Los cebadores de los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla 2.

#### 25 Construcción de pUC19-T7- Paso 1

30 La construcción de pUC19-T7 se describe a continuación, los resultados de la construcción en un vector pUC19 que contiene una región promotora T7 seguida de una región de espacio corto y una secuencia eucariota de Kozak óptima. Esto es una parte esencial del constructo de presentación en ribosoma que se requiere para la iniciación de la transcripción de cualquier secuencia unida en lisados de reticulocitos de conejo. Las secuencias para la presentación en ribosoma como el A6scTCR-Ckappa se pueden ligar en el vector pUC19-T7 entre los sitios de restricción Nco1 y EcoR1.

35 Se aparearon cantidades equimolares de los cebadores Rev-link y For-link por calentamiento a 94 °C durante 10 min y enfriando lentamente la reacción hasta temperatura ambiente. Esto produjo la formación de un complejo de ADN bicatenario que se puede ver a continuación.

```
5' AGCTGCAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGGCCACCATGG
      CGTCGATTATGCTGAGTGATATCCTTGTCCGGTGGTACCCTAG 3'
```

#### (SEQ ID 51)

40 La región 5' contiene un extremo sobresaliente pegajoso complementario de un sitio de restricción HindIII mientras que el extremo 3' contiene un extremo pegajoso que es complementario de un sitio de restricción BamH1. Los oligonucleótidos apareados se ligaron en pUC19 doblemente digerido con Hind III/BamHI, que había sido purificado por electroforesis en gel de agarosa, escindido y purificado adicionalmente con el kit de extracción de gel Qiagen. Los ligamientos se transformaron en E. coli XL1-BLUE. Se secuenciaron los clones de pUC19-T7 individuales para confirmar la presencia de la secuencia correcta. La secuencia se muestra en la figura 8.

#### 45 Construcción del vector A6scTCR-C-Kappa - Paso 2.

50 La construcción de la secuencia de ADN de una sola cadena A6scTCR-C-Kappa requiere la generación de tres fragmentos de PCR que se deben ensamblar en un fragmento A6scTCR-C-Kappa. Los fragmentos consisten en (a.) la región variable alfa de TCR A6 flanqueada por un sitio Nco1 en la región 5' y una sección del conector Glicina Serina en la región 3' flanqueada por un sitio de restricción BamH1. Este producto se generó mediante una PCR estándar del vector pEX202 con los cebadores 45 y 50 (Véase la tabla 2). Fragmento (b.) región variable y constante beta de TCR A6 flanqueada por un sitio de restricción BamH1 en la región 5' seguida de una sección del conector Glicina Serina. Este producto se generó mediante una PCR estándar del vector pEX202 con los cebadores 72 y 73 (Véase la tabla 2). Fragmento (c.) Porción de una región C-kappa humana generada mediante PCR estándar del vector p147 con los cebadores 61-60 (Véase la tabla 2). Todos los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.6% en TBE y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron utilizando el kit de extracción de gel Qiagen.

Fragmentos (b.) y (c.) se fusionaron mediante una PCR de superposición estándar mediante la complementariedad en las secuencias de sus cebadores 73 y 61 (Véase la tabla 2). La PCR se llevó a cabo mediante los cebadores 72 y 60 (Véase la tabla 2). Todos los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.6% en TBE y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron utilizando el kit de extracción de gel Qiagen. Este fragmento se denomina (d.).

El fragmento (a.) se digirió dos veces con Nco1 y BamH1 mientras que el fragmento (d.) se digirió dos veces con BamH1 y EcoR1. pUC19-T7 se digirió dos veces con Nco1 y EcoR1. Todos los productos de ADN digeridos se corrieron en un gel de agarosa 1.2% en TBE y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron utilizando el kit de extracción de gel Qiagen. pUC19-T7 y los fragmentos (a.) y (d.) digeridos se ligaron y transformaron en E. coli XL1-BLUE. Los transformantes se secuenciaron para confirmar la secuencia correcta. La secuencia del constructo de presentación en ribosoma A6scTCR-C-Kappa que se clonó en pUC19 se muestra en la figura 9 flanqueada por sus sitios Pst1 y EcoR1.

Tabla 2.

Oligonucleótidos utilizados (adquiridos a MWG)	
Rev-Link	5'GATCCCATGGTGGCCTGTTCTATAGTGAGTCGTATTAGCTGC (SEQ ID 52)
For-Link	5'AGCTGCAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGGCCACCATGG (SEQ ID 53)
45-A6	5'CCACCATGGGCCAGAAGGAAGTGGAGCAGAACTC (SEQ ID 54)
7 A6-Beta(RT-PCR)(a)	5'CGAGAGCCCGTAGAACTGGACTTG (SEQ ID 55)
49-A6-BamH1-F	<b>5' GTGGATCCGGCGGTGGCGGGTCGAACGC TGGTGTCA CTCAGACCCC (SEQ ID 56)</b>
50-A6-BamH1-R	<b>5' CCGGATCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCGGTGACCACAAC CTGGGTCCCTG (SEQ ID 57)</b>
60-Kappa-rev-EcoR1	5' CTGAGAATTCTTATGACTCTCCGCGGTTGAAGCTC (SEQ ID 58)
61-Beta-Kappa-for1	5' TGACGAATTCTGACTCTCCGCGGTTGAAGCTC (SEQ ID 59)
71 T7-Cebador	5' AGCTGCAGCTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID 60)
72 A6-beta	5'GGCCACCATGGGCAACGCTGGTGTCACTCAGACCCC (SEQ ID 61)
73-A6-cons-rev	5'TGAACCGCCTCCACCGTCTGCTCTACCCAGGCCTCGGCG (SEQ ID 62)
75 Kappa-rev	5'TGACTCTCCGCGGTTGAAGCTC (SEQ ID 63)

Demostración de la producción de sc A6 TCR-C-Kappa mediante transcripción/traducción in vitro

Preparación del producto de PCR scA6 TCR-C-Kappa para la transcripción/traducción in vitro.

En este documento describimos la síntesis de sc A6 TCR-C-Kappa mediante transcripción/traducción in vitro en presencia de lisina biotinilada y su detección posterior mediante inmunotransferencia tipo western y la detección con estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina.

El producto de PCR sc A6 TCR-C-Kappa se preparó en una reacción de PCR estándar usando el vector sc A6 TCR-C-Kappa como plantilla y los cebadores de PCR 71 y 60. El cebador 60 contiene un a codón de parada para permitir la liberación de scTCR del ribosoma. Se usó la polimerasa Pfu (Stratagene) para mayor fidelidad durante la síntesis por PCR. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.6% en TBE y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron utilizando el kit de extracción de gel Qiagen.

Las reacciones de transcripción/traducción se llevaron a cabo usando el kit de transcripción/traducción PROTEINscript II Linked transcription translation de Ambion Cat 1280-1287 con 300 ng del producto de PCR descrito antes. Se montaron 3 reacciones de transcripción/traducción según el protocolo del fabricante. La única



modificación fue el agregado de lisina biotinilada del Sistema de detección de la traducción no radiactivo Transcend™.

- 5 Reacción 1 sc A6 TCR-C-Kappa 300 ng con 2 µl de lisina biotinilada  
 Reacción 2 sc A6 TCR-C-Kappa 300 ng con 2 µl de lisina biotinilada  
 Reacción 3 Control sin ADN con 2 µl de lisina biotinilada.

10 Se corrieron dos microlitros de cada reacción con un gradiente de 4-20% de Novex en un gel de SDS-PAGE (Invitrogen). Además se corrieron varias diluciones de un control de TCR biotinilado. El gel se inmunotransfirió y las proteínas se detectaron con estreptavidina con fosfatasa alcalina y luego se desarrollaron colorimétricamente con sustrato estabilizado Western Blue® para fosfatasa alcalina como se describe en el protocolo del Sistema no radiactivo de detección de la traducción Transcend™. La inmunotransferencia tipo western se muestra en la figura 10.

15 En el control sin ADN y la reacción de A6scTCR-C-Kappa sin lisina biotinilada no se puede ver ninguna banda de aproximadamente el tamaño correcto como se esperaba, mientras que en la reacción de A6scTCR-C-Kappa en presencia de lisina biotinilada se puede ver una banda de aproximadamente el tamaño correcto. Esto demuestra la síntesis de TCR sc A6 TCR-C-Kappa por transcripción/traducción in vitro.

20 Preparación del producto de PCR de presentación en ribosoma sc A6 TCR-C-Kappa.

25 El producto de PCR sc A6 TCR-C-Kappa se preparó en una reacción de PCR estándar usando el vector A6scTCR-C-Kappa como plantilla y los cebadores de PCR 71 y 57 (Véase la tabla 2). El cebador 75 no contiene un codón de parada. Se usó la polimerasa Pfu (Stratagene) para mayor fidelidad durante la síntesis por PCR. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1.6% en TBE y las bandas de ADN del tamaño correcto se escindieron y purificaron utilizando el kit de extracción de gel Qiagen.

Proceso de presentación en ribosoma

30 Transcripción y traducción de sc A6 TCR-C-Kappa

Las reacciones de transcripción / traducción se llevaron a cabo usando el kit de transcripción traducción PROTEINscript II Linked transcription translation de Ambion (Cat 1280-1287).

35 Reacciones de transcripción

Las reacciones de transcripción siguientes se montaron en tubos antiadherentes Ambion de 0.5 ml (Nº de cat. 12350).

Contenido	Tubo 1 (A6 Normal)	Tubo 2 (Control)
Agua	4.53 µl	5.7 µl
Plantilla (producto de PCR)	Producto de PCR Sc A6 TCR-C-Kappa 1.17 µl (300 ng)	Sin ADN
5 X mezcla de transcripción	2 µl	2 µl
Mezcla de enzimas	2 µl	2 µl
Supersin inhibidor de ARNasa ambion	0.3 µl	0.3 µl
Volumen final	10 µl	10 µl

40 Los tubos se incubaron a 30 °C durante 60 min en un bloque de PCR sin la tapa caliente.

Reacciones de traducción

45 Las reacciones de traducción siguientes se montaron en tubos antiadherentes Ambion de 0.5 ml

Contenido	1 (A6 Normal)	2 (Control)
Lisado de reticulocitos	105 µl	105 µl
Acetato de Mg 25 mM	3 µl	3 µl
Mezcla de traducción	7.5 µl	7.5 µl

## ES 2 451 691 T3

Contenido	1 (A6 Normal)	2 (Control)
Metionina	7.5 µl	7.5 µl
Agua	18 µl	18 µl
Superasin <small>inhibidor de la ARNasa</small>	3 µl	3 µl
Reacción de transcripción	6 µl tubo 1 anterior	6 µl tubo 2 anterior

Cada tubo contiene suficiente para 3 selecciones x 50 µl. Los tubos se mezclaron a 30 °C durante 60 min en un bloque de PCR sin la tapa caliente Después de 30 min se agregaron 3 unidades de ADNasa RQ1 exenta de ARNasa (Promega) para destruir a la plantilla de ADN original en el tubo de 1, y 3 unidades de ADNasa RQ1 exenta de ARNasa (Promega) en el tubo 2. Después de 60 min se agregaron 18 µl de solución de heparina a la reacción de traducción 2 y se agregaron 18 µl de la solución de heparina a la reacción de traducción 1. Las muestras se almacenaron en hielo listas para la selección contra perlas recubiertas con HLA.

Recubrimiento de perlas magnéticas.

Se transfirieron 20 µL de partículas magnéticas de estreptavidina resuspendidas (Roche N° Cat. 1641778) a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml exento de ARNasa. Las perlas se inmovilizaron con un separador de partículas magnéticas (Roche N° Cat. 1641794) y se eliminó el sobrenadante. Después las perlas se lavaron con 100 µl de 1 sin ARNasa X PBS (10 x PBS Ambion N° Cat 9624, H<sub>2</sub>O Ambion N° Cat 9930) las perlas se inmovilizaron y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron un total de 3 lavados con PBS.

Las perlas se resuspendieron en 20 µl de PBS y el contenido se repartió uniformemente entre dos tubos (10 µl cada uno). Un tubo se utilizará para producir perlas bloqueadas con el control y los otros tubos para producir perlas recubiertas con HLA-A2-Tax.

Al tubo de las perlas de control se le agregaron 80 µl de solución de BSA/biotina y se mezcló. La solución de BSA/biotina se preparó de la manera siguiente. Se agregaron 10 µl de una solución de biotina 0.1 M base Tris 0.2 M a 990 µl de PBS con 0.1% de BSA (Ambion Uetrapura N° Cat 2616). También se agregaron 20 µl de solución de heparina (138 mg/ml de heparina (Sigma H-3393) en 1 x PBS) y la solución se mezcló. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando intermitentemente. Después las perlas se lavaron tres veces con 100 µl de PBS y se resuspendieron en 10 µl de PBS con 0.1% de BSA.

Las perlas recubiertas con HLA-TAX se prepararon de la manera siguiente. Se agregaron 40 µl de HLA-A2-Tax (1.15 mg/ml preparado como se describe en WO99/60120) a 10 µl de perlas y se mezcló. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se agregaron 20 µl de 50 mg/ml de BSA Ambion Cat 2616 y 20 µl de solución de heparina (véase antes) y se mezcló. Las perlas se incubaron durante otros 45 min y luego se agregaron 20 µl de solución de BSA/biotina. Después las perlas se lavaron tres veces con 100 µl de PBS y se resuspendieron en 10 µl de PBS con 0.1% de BSA.

Selección (panning) con perlas magnéticas

La reacción de traducción de sc A6 TCR se dividió en tres alícuotas de 50 µl y cada alícuota recibió 2 µl de alguna de las perlas siguientes:

Control (sin HLA)  
HLA-A2 Tax  
HLA-A2-Tax más 10 µg de scA6 TCR soluble

También se llevó a cabo una reacción de traducción de control y se dividió en tres alícuotas de 50 µl y cada alícuota recibió 2 µl de alguna de las perlas siguientes:

Control (sin HLA)  
HLA-A2 Tax  
HLA-A2-Tax más 10 µg de sc A6 TCR soluble

Esto dio un total de seis tubos. Los tubos se incubaron en un bloque de PCR a 5 °C durante 60 minutos mezclando intermitentemente.

Luego las perlas se lavaron tres veces con 100 µl de tampón helado (PBS, acetato de mg 5 mM, 0.2% de Tween 20 (exenta de ARNasa Sigma). Después cada alícuota de perlas se resuspendió en 50 µl de tampón de digestión 1 x ADNasa RQ1 que contenía 1 µl (40 U) de Superasin y 1 µl (1U) de ADNasa RQ1. Las perlas se incubaron en un bloque de PCR durante 30 min a 30 °C.

Luego las perlas se lavaron tres veces con 100 µl de tampón helado (PBS, acetato de mg 5 mM, 0.2% de Tween 20) y una vez con H<sub>2</sub>O helada. Las perlas se resuspendieron en 10 µl de ARNasa exenta de H<sub>2</sub>O. Después las perlas se congelaron listas para RT-PCR.

5 RT-PCR de ARNm de sc A6 TCR-C-Kappa en perlas recuperadas de reacciones de presentación en ribosoma.

Las reacciones de RT PCR en las perlas se llevaron a cabo utilizando un tubo de un kit de RT-PCR Titan Cat 1855476 como se describe en los protocolos del fabricante. Se agregaron dos microlitros de perlas en cada reacción de RT-PCR junto con los cebadores 45 y 7, y 0.3 µl del inhibidor de ARNasa Supersasin.

10 Para cada reacción de RT-PCR se montó una segunda reacción sólo de PCR que difirió únicamente en el hecho de que no había presente transcriptasa inversa sólo polimerasa de alta fidelidad de Roche. Esta segunda reacción sirvió como control de la contaminación de ADN. Además se montó un control positivo de RT-PCR usando 1 ng del vector sc A6 TCR-C-Kappa.

15 Las reacciones se ciclaron de la manera siguiente. Un paso de RT-PCR se llevó a cabo incubando las muestras a 50 °C durante 30 min, seguido de la inactivación de la transcriptasa inversa por incubación a 94 °C durante 3 minutos en un bloque de PCR.

20 Las reacciones fueron los ciclos de PCR siguientes por un total de 38 ciclos:

94 °C 30 segundos

55 °C 20 segundos

25 68 °C 130 segundos.

La reacción de PCR se terminó por incubación a 72 °C durante 4 minutos.

30 Se debe tener mucho cuidado durante todas las etapas de presentación en ribosoma para evitar la contaminación con ARNasa. Las reacciones de RT-PCR y PCR se corrieron en un gel de agarosa en 1.6% de TBE que se puede ver en la figura 11. El análisis del gel muestra que no hay ninguna contaminación con ADN y que todos los productos de PCR derivan de ARNm. La banda de ADN del tamaño correcto en el carril 2 demuestra que el sc A6 TCR-C-Kappa presentado en ribosoma se seleccionó mediante perlas recubiertas con HLA-A2-Tax. El carril 3 muestra que podemos inhibir esta selección específica de sc A6 TCR-C-Kappa presentado en ribosoma mediante la adición de sc A6 TCR soluble. Esto lo demuestra a reducción significativa en la intensidad de la banda en el carril 3 respecto a la muestra sin inhibir en el carril 2. No se pudo mostrar ninguna unión de sc A6 TCR-C-Kappa presentado en ribosoma contra perlas de control no recubiertas con HLA.

40 Ejemplo 6 - Análisis de secuencia de clones de TCR A6 presentados en partículas fágicas y métodos para mejorar las características de presentación

45 Después de la construcción de vectores para presentar TCR A6 en fago mediante PCR y clonación molecular, se cribaron los clones bacterianos que pueden producir partículas fágicas que presentan TCR A6 con fago-ELISA como se describe en el ejemplo 4. Se identificaron tres clones diferentes que mostraron unión específica a HLA-A2-tax en el ensayo de unión por ELISA.

Todos estos clones contenían mutaciones en el ADN de TCR A6 de 'tipo silvestre' o en las secuencias reguladoras asociadas, que se describen en la tabla siguiente

50 Clones funcionales del cribado de TCR A6 presentados en fago

Nombre	Característica	
Clon 7	El tercer sitio de unión del ribosoma, que se encuentra delante del gen vβ, está mutado de AAGGAGA a AAGGGGA.	
Clon 9	Se introduce un codón ópalo en CDR3 de vβ.	Secuencia completa de ADN y aminoácidos en figuras 12a y 12b
Clon 49	Se introduce un codón ámbar en FR1 de vβ. Esta mutación introduce una mutación 'silenciosa' que no afecta la secuencia de aminoácidos resultante	Secuencia completa de ADN en figura 13a

Todos estos clones contenían las mutaciones que es más probable que causen una reducción en los niveles de



Nombre del cebador	Secuencia, 5' a 3'
YOL71	TGTGCCTCGAGGccgNNKNNKNNKNNKg ggCGACCAGAGCAGTACTTCG (SEQ ID 78)
YOL58	AAACTGAAGCTTMNNMNNMNNMNNMNT GTAACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 79)
YOL72	AAACTGAAGCTTMNNMNNgctgtcMNT GTAACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 80)
YOL73	AAACTGAAGCTTMNNMNNMNNgctgtcM NNTGTAACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 81)
YOL74	AAACTGAAGCTTMNNMNNgctgtcMNNA ACGGCACAGAGGTAG (SEQ ID 82)

Los fragmentos de la cadena  $\alpha$  se digirieron con NcoI y HindIII y se volvieron a purificar usando un kit de Qiagen y el vector se preparó digiriendo el clon 9 con NcoI y HindIII seguido de purificación en gel usando un kit de Qiagen. Los fragmentos de la cadena  $\beta$  se digirieron con Xho I y Not I y se volvieron a purificar usando un kit de Qiagen y el vector se preparó digiriendo el clon 9 con Xho I y Not I seguido de purificación en/de gel usando un kit de Qiagen. Los insertos y vectores purificados en una relación molar 3:1 se mezclaron con tampón de ligasa T4, ligasa T4 y agua exenta de nucleasa. Los ligamientos se llevaron a cabo en un baño de agua a 16 °C durante la noche. Para cada colección de mutación, se electroporó un total de 0.5 a 1  $\mu$ g de productos ligados purificados en E. coli TG1 en una relación de 0.2  $\mu$ g de ADN por 40  $\mu$ l de células competentes para electroporación (Stratagene) siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante. Después de la electroporación, las células se resuspendieron inmediatamente con 960  $\mu$ l de medio SOC a 37 °C y se distribuyeron en una placa de cultivo tisular de 244 mm x 244 mm que contenía YTE (15 g de Agar Bacto, 8 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura en 1 litro) complementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa. La placa se incubó a 30 °C durante la noche. Después las células se rasparon de las placas con 5 ml de DYT (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1 litro, autoclavado a 125 °C durante 15 minutos) complementado con 15% de glicerol.

Con el fin de que las partículas fágicas presentaran TCR A6, se inocularon 500 ml de DYT<sub>ag</sub> (DYT que contenía 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa) con 500 a 1000  $\mu$ l de las existencias de la colección. Se permitió que el cultivo alcanzara una  $DO_{600nm} = 0.5$ . Se infectaron 100 ml del cultivo con fago auxiliar (M13 K07 (Invitrogen), o HYPER PHAGE (Progen Biotechnik, GmbH 69123 Heidelberg) y se incubaron a 37 °C en baño de agua durante 30 minutos. El medio se reemplazó con 100 ml de DYT<sub>ak</sub> (DYT que contenía 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 25  $\mu$ g/ml de kanamicina). Luego el cultivo se incubó con agitación a 300 rpm y 25 °C durante 20 a 36 horas.

#### Ejemplo 8 - Aislamiento de mutantes de alta afinidad de TCR A6

El aislamiento de mutantes de alta afinidad de TCR A6 se llevó a cabo por dos métodos diferentes.

El primer método consiste en seleccionar las partículas fágicas que presentan TCR A6 mutantes capaces de unirse al complejo HLA-A2 Tax usando inmunotubos Maxisorp (Invitrogen). Los inmunotubos se recubrieron con 1 a 2 ml de estreptavidina 10  $\mu$ g/ml en PBS durante la noche a temperatura ambiente. Después los tubos se lavaron dos veces con PBS, y luego se agregó 1 ml de complejo HLA-A2 Tax biotinilado a una concentración de 5  $\mu$ g/ml en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. El resto del protocolo para la selección de conectores de alta afinidad es como se describió anteriormente (Li et al (2000) Journal of Immunological Methods 236: 133-146), salvo por las modificaciones siguientes. La selección se realizó en tres o cuatro rondas. Las concentraciones de complejo HLA-A2 Tax biotinilado fueron 5  $\mu$ g/ml para la primera ronda de selección, 0.5  $\mu$ g/ml para la segunda, 0.05  $\mu$ g/ml para la tercera y 0.005  $\mu$ g/ml para la cuarta ronda de selección. Para la selección se usaron fagos auxiliares M13 K07 en las rondas uno y dos, e hiperfagos en las rondas posteriores.

El segundo método utilizado fue la selección de las partículas fágicas que presentan TCR A6 mutantes capaces de

unirse al complejo HLA-A2 Tax en solución. Se prelavaron perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynal M280) conforme al protocolo del fabricante. Las partículas fágicas, que presentan TCR A6 mutados a una concentración de  $10^{12}$  a  $10^{13}$  ufc, se premezclaron con el complejo HLA-A2 Tax biotinilado a concentraciones de  $2 \times 10^8$  M,  $2 \times 10^9$  M,  $2 \times 10^{10}$  M y  $2 \times 10^{11}$  M para la primera, segunda, tercera y cuarta ronda de selección respectivamente. La mezcla de partículas fágicas que presentan TCR A6 y el complejo HLA-A2 Tax se incubó durante una hora a temperatura ambiente con rotación suave y las partículas fágicas que presentan TCR A6 unidas al complejo HLA-A2 Tax biotinilado se capturaron utilizando 200  $\mu$ l (ronda 1) o 50  $\mu$ l (rondas 2, 3 y 4) de perlas magnéticas M280 recubiertas de estreptavidina. Después de la captura de las partículas fágicas, las perlas se lavaron un total de diez veces (tres veces en PBS-tween20, dos veces en PBS-tween 20 que contenía 2% de leche desnatada en polvo, dos veces en PBS, una vez en PBS que contenía 2% de leche desnatada en polvo y dos veces en PBS) utilizando un concentrador de partículas magnéticas Dynal. Después del último lavado, las perlas se resuspendieron en 1 ml de trietilamina 100 mM pH 11.5 recién preparada y se incubaron durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente con rotación suave. Las partículas fágicas eluidas de las perlas se neutralizaron inmediatamente con 300  $\mu$ l de tris-HCl 1 M pH 7.0. La mitad del eluido se utilizó para infectar 10 ml de E. coli TG1 fresco a una DO(600 nm) = 0.5 para la amplificación de las partículas fágicas seleccionadas según los métodos descritos previamente (Li et al., (2000) Journal of Immunological Methods 236: 133-146). 133-146).

Después de la tercera o cuarta ronda de selección, se picaron 95 colonias de las placas y se utilizaron para inocular 100  $\mu$ l de DYTag en una placa de microtitulación de 96 pocillos. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación durante toda la noche. Después se sub inocularon 100  $\mu$ l de DYTag con 2 a 5  $\mu$ l de los cultivos de toda la noche y se incubaron a 37 °C con agitación durante 2 a 3 horas o hasta que el cultivo se volvió turbio. Para infectar las células con fago auxiliar, el cultivo se infectó con 25  $\mu$ l de DYTag que contenía  $5 \times 10^9$  ufp de fago auxiliar y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El medio fue sustituido por DYTak. Las placas se incubaron a 25 °C por 20 a 36 horas con agitación a 300 rpm. Las células se precipitaron por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se utilizaron para el cribado de mutantes de alta afinidad de TCR A6 por fago-ELISA competitivo como sigue.

Se enjuagaron dos veces con PBS pocillos Nunc-Immuno Maxisorp recubiertos con estreptavidina. Se agregaron 25  $\mu$ l de complejo HLA-A2-Tax biotinilado 5  $\mu$ g/ml a cada pocillo y éstos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos seguido de dos enjuagues con PBS. Los sitios de unión de proteína no específicos de los pocillos se bloquearon mediante adición de 300  $\mu$ l de leche desnatada al 3% en PBS seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Para preparar las partículas fágicas que presentan TCR A6 heterodimérico, se mezclaron las partículas fágicas con leche desnatada al 3% en PBS que contenía HLA-A2-Tax 0, 20 y 200 nM, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. El fago se agregó a los pocillos recubiertos con HLA-A2-Tax y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de 3 lavados con PBS con 0.1% de tween 20 y luego 3 lavados con PBS. Las partículas fágicas que presentan TCR unidas se detectaron con un anticuerpo anti-fd (Sigma) como se describió en el ejemplo 4.

Se identificaron varios mutantes de TCR A6 de alta afinidad putativos y las secuencias de CDR3 se indican en las dos tablas siguientes junto con las secuencias de tipo silvestre correspondientes. Se encontraron codones de parada ámbar (X) en todos los mutantes de la cadena  $\beta$  y un mutante de la cadena  $\alpha$ .

Mutantes de la cadena $\beta$ de TCR A6	
Clon	Secuencia de CDR3
Tipo silvestre	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEQ ID 83)
	A S R P G L A G G R P E Q Y (SEQ ID 84)
134	GCCTCGAGGCCGGGGCTGATGAGTGCGTAGCCAGAGCAGTAC (SEQ ID 85)
	A S R P G L M S A X P E Q Y (SEQ ID 86)
86	GCCTCGAGGCCGGGGCTGAGGTCGGCGTAGCCAGAGCAGTAC (SEQ ID 87)
	A S R P G L R S A X P E Q Y (SEQ ID 88)
87	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGGCGTAG (SEQ ID 89)
	A S R P G L A G G R P E A X (SEQ ID 90)
89	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGGATTAG ID (SEQ 91)
	A S R P G L A G G R P E D X (SEQ ID 92)
85	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGATCAGTAG (SEQ ID 93)
	A S R P G L A G G R P D Q X (SEQ ID 94)

ES 2 451 691 T3

Mutantes de la cadena $\beta$ de TCR A6	
Clon	Secuencia de CDR3
83	GCCTCGAGGCCGGGTCTGTAGGCTGGGCGACCAGAGCAGTAC (SEQ ID 95)
	A S R P G L X A G R P E Q Y (SEQ ID 96)
1	GCCTCGAGGCCGGGGCTGTTCCGGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEQ ID 97)
	A S R P G L V P G R P E Q X (SEQ ID 98)
2	GCCTCGAGGCCGGGGCTTGTGTCTGCTTAGCCAGAGCAGTAC (SEQ ID 99)
	A S R P G L V S A X P E Q Y (SEQ ID 100)
111	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCACATCCGTAG (SEQ ID 101)
	A S R P G L A G G R P H P X (SEQ ID 102)
125	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGATGCGTAG (SEQ ID 103)
	A S R P G L A G G R P D A X (SEQ ID 104)
133	GCCTCGAGGCCGGGTCTGATTAGTGCTTAGCCAGAGCAGTAC (SEQ ID 105)
	A S R P G L I S A X P E Q Y (SEQ ID 106)
Mutantes de la cadena $\alpha$ de TCR A6	
Clon	CDR3
Tipo silvestre	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAAGCTTCAG (SEQ ID 107)
	A V T T D S W G K L Q (SEQ ID 108)
149	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGCCGCTTCAG (SEQ ID 109)
	A V T T D S W G P L Q (SEQ ID 110)
65	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAAGATGCAG (SEQ ID 111)
	A V T T D S W G K M Q (SEQ ID 112)
66	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAAGTTGCAT (SEQ ID 113)
	A V T T D S W G K L H (SEQ ID 114)
153	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGTAGCTTCAT (SEQ ID 115)
	A V T T D S W G X L H (SEQ ID 116)
71	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGGAGCTTCAT (SEQ ID 117)
	A V T T D S W G E L H (SEQ ID 118)
70	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAGGCTGCAT (SEQ ID 119)
	A V T T D S W G R L H (SEQ ID 120)
121	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGCAGCTTCAT (SEQ ID 121)
	A V T T D S W G Q L H (SEQ ID 122)
117	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAAGGTTTCAT (SEQ ID 123)
	A V T T D S W G K V H (SEQ ID 124)
72	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAAGGTGAAT (SEQ ID 125)
	A V T T D S W G K V N (SEQ ID 126)
150	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAAGCTTCTG (SEQ ID 127)
	A V T T D S W G K L L (SEQ ID 128)

Ejemplo 9 - Producción de TCR A6 heterodimérico soluble con enlace disulfuro no nativo entre las regiones constantes, que contiene mutaciones en CDR3

Se aisló el ADN del fagómido que codifica los mutantes de TCR A6 de alta afinidad identificados en el ejemplo 8 a partir de las células de *E. coli* pertinentes utilizando un kit Mini-Prep (Quiagen, Reino Unido)

5 Se usó amplificación por PCR utilizando el ADN del fagómido como blanco y los cebadores siguientes para amplificar las secuencias de ADN de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR soluble.

Cebador hacia delante de cadena alfa de TCR A6  
ggaattc atcgatg cagaaggaagtgagcag (SEQ ID 129)  
(Sitio de restricción del ClaI está subrayado)

10 Cebador reverso universal de la cadena alfa de TCR  
gtacacggccgggtcagggtctggatatac (SEQ ID 130)  
(Sitio de restricción EagI está subrayado)

Cebador hacia delante de la cadena beta de A6  
Tctctcattaatgaatgctggtgctcactcagacccc (SEQ ID 131)  
(Sitio de restricción AseI está subrayado)

15 Cebador reverso universal de la cadena beta  
Tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtggc (SEQ ID 132)  
(Sitio de restricción AgeI está subrayado)

20 En el caso de la cadena  $\beta$  de TCR se llevó a cabo otra costura de PCR para reemplazar el codón de parada ámbar en la región CDR3 con un codón que codifica el ácido glutámico. Cuando se suprime un codón de parada ámbar en *E. coli*, normalmente se introduce un residuo de glutamina en vez de detener la traducción. Por lo tanto, cuando TCR que contiene el codón ámbar se presenta en la superficie del fago, contiene un residuo de glutamina en esta posición. Sin embargo, cuando el gen de la cadena  $\beta$  de TCR se transfirió al plásmido de expresión, se usó un residuo de ácido glutámico como alternativa a la glutamina. Los cebadores utilizados para esta costura de PCR fueron los siguientes.

YOL124 CTGCTCTGGTTCCGCACTC

30 (SEQ ID 133)

YOL125 GAGTGCGGAACCAGAGCAG

35 (SEQ ID 134)

La secuencia del ADN de la cadena  $\beta$  mutada de TCR A6 soluble se verificó mediante secuenciación automatizada (véase figura 14a para la secuencia de ADN mutada de la cadena  $\beta$  de TCR A6 y 14b para la secuencia de aminoácidos codificada de ese modo). La figura 14 c muestra la secuencia de aminoácidos mutada de la cadena  $\beta$  de TCR A6 sin la sustitución de glutamina a ácido glutámico, es decir la secuencia que estaba presente en el clon 134 según se aisló mediante fago-ELISA

40 Estas secuencias del ADN de  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR A6 se utilizaron después para producir un TCR A6 soluble como se describe en WO 03/020763. En resumen, las dos cadenas se expresan como cuerpos de inclusión en cultivos de *E. coli* separados. Después los cuerpos de inclusión se aíslan, desnaturalizan y se vuelven a plegar juntos *in vitro*.

45 Ejemplo: 10 - Caracterización por resonancia de plasmones superficiales BIAcore de una unión de TCR A6 de alta afinidad con HLA-A2 Tax.

50 Se usó un biosensor de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore 3000 <sup>TM</sup>) para analizar la unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad (véanse las figuras 15a & 15b por las secuencias completas de ADN y aminoácidos de la cadena  $\beta$  mutada de TCR, respectivamente) con el ligando HLA-A2 Tax. Esto se facilitó mediante la producción de complejos pMHC (descritos a continuación) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de manera semiorientada, permitiendo el análisis eficaz de la unión de un receptor de linfocitos T soluble con hasta cuatro pMHC diferentes (inmovilizados en celdas de flujo diferentes) simultáneamente. La inyección manual del complejo HLA permite manipular fácilmente el nivel exacto de moléculas clase I inmovilizadas.

60 Los complejos HLA-A2 tax biotinilados clase I se volvieron a plegar *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión expresados en bacterias que contenían las proteínas y péptidos sintéticos constituyentes de la subunidad, seguido de purificación y biotinilación enzimática *in vitro* (O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). La cadena pesada HLA se expresó con un marcador (tag) de biotinilación C-terminal que reemplaza los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína en un constructo apropiado. Se obtuvieron niveles de expresión de los cuerpos de inclusión de ~ 75 mg/litro de cultivo bacteriano. La cadena ligera de HLA o  $\beta$ 2-microglobulina también se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli* a partir de un constructo apropiado, a un nivel de ~500 mg/litro de cultivo bacteriano.



5 Se lisaron células de *E. coli* y se purificaron los cuerpos de inclusión hasta aproximadamente 80% de pureza. Se desnaturizó la proteína de los cuerpos de inclusión en guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8.1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM y se volvió a plegar a una concentración de 30 mg/litro de cadena pesada, 30 mg/litro de  $\beta$ 2m en L-Arginina-HCl 0.4 M, Tris 100 mM, pH 8.1, cistamina 3.7 mM, cisteamina mM, 4 mg/ml de péptido (por ejemplo tax 11-19), mediante adición de un solo pulso de proteína desnaturizada en tampón de replegamiento a  $<5$  °C. Se permitió que el replegamiento se completara a 4 °C durante al menos 1 hora.

10 Se intercambió el tampón mediante diálisis en 10 volúmenes de Tris 10 mM pH 8.1. Fueron necesarios dos cambios de tampón para reducir suficientemente la fuerza iónica de la solución. Después la solución de proteína se filtró a través de un filtro de 1.5  $\mu$ m de acetato de celulosa y se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ (volumen del lecho 8 ml). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM. El complejo HLA-A2-péptido eluyó a aproximadamente NaCl 250 mM, y se recogieron las fracciones de los picos, se agregó un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron con hielo.

15 Se intercambió el tampón de los complejos HLA-A2 marcados con biotilación en Tris 10 mM, pH 8.1, NaCl 5 mM, utilizando una columna de desalinización rápida de Pharmacia equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contenían la proteína se enfriaron en hielo y se agregó cóctel inhibidor de proteasa (Calbiochem). Luego se añadieron los reactivos de biotilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado a pH 8),  $MgCl_2$  7.5 mM y 5  $\mu$ g/ml de enzima BirA (purificada según O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15).  
20 Después la mezcla se dejó en incubación a temperatura ambiente durante la noche.

25 Los complejos HLA-A2 biotilados se purificaron mediante cromatografía de filtración en gel. Se pre equilibró una columna Pharmacia Superdex 75 HR 10/30 con PBS filtrado y se cargó 1 ml de mezcla de reacción de biotilación y la columna se desarrolló con PBS a 0.5 ml/min. Los complejos HLA-A2 biotilados eluyeron como un solo pico a aproximadamente 15 ml. Se agruparon las fracciones que contenían proteína, se enfriaron con hielo, y se les añadió cóctel inhibidor de proteasa. Se determinó la concentración de proteína usando un ensayo de unión con Coomassie (PerBio) y se almacenaron alícuotas de los complejos HLA-A2 biotilados congeladas a -20 °C. Se inmovilizó la estreptavidina por métodos estándar de acoplamiento de amina.

30 Las interacciones entre TCR A6 Tax de alta afinidad que contenía un nuevo enlace intercatenario y el complejo HLA-A2 Tax o una combinación de HLA-A2 NY-ESO irrelevante, cuya producción se describe antes, se analizaron en un biosensor de resonancia de plasmones superficiales (SPR) BIAcore 3000™. Los cambios en las medidas de SPR en el índice de refracción expresado en unidades de respuesta (RU) cerca de la superficie de un sensor dentro de una celda de flujo pequeña, un principio que se puede utilizar para detectar las interacciones receptor-ligando y para  
35 analizar su afinidad y parámetros cinéticos. Se prepararon celdas de flujo sonda por inmovilización de los complejos HLA-A2 péptido individuales en celdas de flujo diferentes mediante la unión entre la biotina reticulada en  $\beta$ 2m y la estreptavidina que ha sido químicamente reticulada a la superficie activada de las celdas de flujo. Después este ensayo se realizó pasando sTCR sobre las superficies de las celdas de flujo diferentes a una velocidad de flujo constante, midiendo la respuesta de SPR al hacerlo. Inicialmente, la especificidad de la interacción se verificó  
40 pasando TCR A6 soluble a una velocidad de flujo constante de 5  $\mu$ l  $min^{-1}$  sobre cuatro superficies diferentes; una cubierta con  $\sim$ 1000 RU de complejo HLA-A2 Tax, la segunda recubierta con  $\sim$ 1000 RU de complejo HLA-A2 NY-ESO y dos celdas de flujo blanco recubiertas solamente con estreptavidina (véase Figura 15).

45 La mayor afinidad de TCR A6 soluble mutado hizo difícil el cálculo de  $k_d$  para la interacción de este grupo con el complejo HLA-A2 Tax. Sin embargo, se calculó que la vida media ( $t_{1/2}$ ) para la interacción era de 51.6 minutos (véase Figura 16), que se compara con una  $t_{1/2}$  para la interacción de tipo silvestre de 7.2 segundos.

Ejemplo 11 - Producción del vector que codifica un TCR NY-ESO soluble que contiene un enlace disulfuro nuevo.

50 La cadena  $\beta$  de TCR A6 soluble preparada en el ejemplo 1 contiene en la secuencia nativa un sitio de restricción BglIII (AAGCTT) adecuado para usar como un sitio de ligamiento.

55 Se realizó una mutagénesis por PCR como se detalla a continuación para introducir un sitio de restricción BamHI (GGATCC) en la cadena  $\alpha$  de TCR A6 soluble, 5' del codón de cisteína nuevo. La secuencia descrita en la figura 2a se utilizó como una plantilla para esta mutagénesis. Se utilizaron los cebadores siguientes:

| BamHI |

5' - ATATCCAGAACCCgGAtCCTGCCGTGTA - 3' (SEQ ID 135)

5' - TACACGGCAGGAaTCcGGGTTCTGGATAT - 3' (SEQ ID 136)

5'-TACACGGCAGGAaTCcGGGTTCTGGATAT-3' (SEQID136)

Se mezclaron 100 ng de plásmido con 5 µl de dNTP 10 mM, 25 µl de tampón 10 x Pfu (Stratagene), 10 unidades de polimerasa Pfu (Stratagene) y el volumen final se ajustó a 240 µl con H<sub>2</sub>O. 48 µl de esta mezcla se complementaron con cebadores diluidos para dar una concentración final de 0.2 µM en 50 µl de volumen de reacción final. Después de un paso de desnaturalización inicial de 30 segundos a 95 °C, la mezcla de reacción se sometió a 15 rondas de desnaturalización (95 °C, 30 s), apareamiento (55 °C, 60 s) y elongación (73 °C, 8 min.) en un equipo de PCR Hybaid PCR express. Después el producto se digirió durante 5 horas a 37 ° C con 10 unidades de enzima de restricción DpnI (New England Biolabs). 10 µl de la reacción digerida se transformaron en bacterias XL1-Blue competentes y se cultivaron durante 18 horas a 37 ° C. Se picó una sola colonia y se cultivó durante la noche en 5 ml de TYP + ampicilina (16 g/l de Bacto-triptona, 16 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 2.5 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg/l de ampicilina). El ADN plasmídico se purificó en una columna mini-prep de Qiagen según las instrucciones del fabricante y la secuencia se verificó mediante secuenciación automatizada en el centro de secuenciación del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford.

Se aisló de linfocitos T el ADNc que codifica TCR NY-ESO según técnicas conocidas. El ADNc que codifica TCR NY-ESO se produjo por tratamiento del ARNm con transcriptasa inversa.

Con el fin de producir vectores que codifiquen un TCR NY-ESO soluble que incorpore un enlace disulfuro nuevo, se usaron plásmidos de TCR A6 que contenían los sitios de restricción BamHI de la cadena α y BglII de la cadena β como plantillas. Se utilizaron los cebadores siguientes:

| NdeI |

5' -GGAGATATACATATGCAGGAGGTGACACAG -3' (SEQ ID 137)

5' -TACACGGCAGGATCCGGGTTCTGGATATT-3' (SEQ ID 138)

| BamHI |

|NdeI |

5' -GGAGATATACATATGGGTGTCACCTCAGACC-3' (SEQ ID 139)

5' -CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCAGGCCTCGGC -3' (SEQ ID 140)

|BglII |

Se obtuvieron los constructos de las cadenas α y β de TCR NY-ESO mediante clonación por PCR como sigue. Se realizaron reacciones de PCR utilizando los cebadores que se muestran antes y plantillas que contenían las cadenas nativas de TCR NY-ESO. Los productos de PCR se digirieron por restricción con las enzimas de restricción pertinentes y se clonaron en pGMT7 para obtener los plásmidos de expresión. La secuencia de los insertos plasmídicos se confirmó por secuenciación de ADN automatizada. Las figuras 17a y 17b muestran la secuencia de ADN de las cadenas α y β mutadas de TCR NY-ESO, respectivamente y las figuras 18a y 18b muestran las secuencias de aminoácidos resultantes.

Ejemplo 12 - Construcción de vectores de presentación en fago y clonación de ADN que codifica las cadenas α y β de TCR NY-ESO en vectores fagomídicos.

Los ADN que codifican las cadenas α y β DNA de TCR NY-ESO soluble que incorporan nuevos codones de cisteína para facilitar la formación de un enlace disulfuro intercatenario no nativo, producidos como se describe en el ejemplo 11, se incorporaron en el vector fagomídico pEX746 de la manera siguiente.

Los ADN que codifican las dos cadenas de TCR NY-ESO se sometieron individualmente a PCR para introducir sitios de clonación compatibles con el vector fagomídico pEX746 (que contiene ADN que codifica el clon 7 de TCR A6) utilizando los cebadores siguientes:

Para la cadena alfa de TCR NY ESO

TRAV21

GCCGGCCATGGCCAAACAGGAGGTGACGCAGATTCCT (SEQ ID 141)

YOL6

CTTCTTAAAGAATTCTTAATTAACCTAGGTTATTAGGAACCTTCTGGGCTG GGAAG (SEQ ID 142)

Para la cadena beta de TCR NY ESO

TRBV6-1/2/3/5/6/7/8/9

TCACAGCGCGCAGGCTGGTGTCACTCAGACCCCAA(SAQ ID 143)

RT1

CGAGAGCCCGTAGAACTGGACTTG (SEQ ID 144)

5 Los métodos de clonación molecular para la construcción de los vectores se describen en "Molecular cloning: A laboratory manual, por J. Sambrook y D. W. Russell". Los cebadores enumerados en la tabla 1 se utilizan para la construcción de los vectores. Un ejemplo del programa de PCR es 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 5 segundos, 53 °C durante 5 segundos y 72 °C durante 90 segundos, seguido de 1 ciclo de 72 °C durante 10 minutos y luego mantenido a 4 °C. La ADN polimerasa Taq de alta fidelidad para expansión se adquirió a Roche.

10 El ADN que codifica la cadena  $\beta$  del clon 7 de TCR A6 se extrajo de pEX746 por digestión con las enzimas de restricción BssHII y BglII. El ADN correspondientemente digerido por PCR que codifica la cadena  $\beta$  de NY-ESO se sustituyó después en el fagómido por ligamiento. La secuencia del producto de clonación se verificó por secuenciación automatizada.

15 Del mismo modo, el ADN que codifica la cadena  $\alpha$  del clon 7 de TCR A6 se extrajo de pEX746 por digestión con las enzimas de restricción NcoI y AvrII. El ADN correspondientemente digerido por PCR que codifica la cadena  $\alpha$  de NY-ESO se sustituyó después en el fagómido que ya contenía el ADN que codifica la cadena  $\beta$  de NY-ESO por ligamiento. La secuencia del producto de clonación se verificó por secuenciación automatizada.

20 Las figuras 19a y 19b detallan respectivamente la secuencia de ADN y de aminoácidos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR NY-ESO así como la secuencia circundante pertinente incorporada en el fagómido (pEX746:NY-ESO). La secuencia que precede el sitio NcoI es igual a pEX746.

25 Ejemplo 13 - Expresión de fusiones de proteína de la cubierta bacteriana y TCR A6 heterodimérico en *E. coli*.

Las partículas fágicas que presentan TCR NY-ESO heterodimérico que contiene un enlace disulfuro intercatenario no nativo se prepararon por los métodos descritos antes para la generación de partículas fágicas que presentan el anticuerpo scFvs (Li et al, 2000, Journal of Immunological Methods 236: 133-146) con las modificaciones siguientes. Se usaron células de *E. coli* TG1 que contenían el fagómido pEX746:NY-ESO (es decir, el fagómido que codifica la cadena  $\alpha$  de TCR NY-ESO soluble y una cadena  $\beta$  de TCR NY-ESO fusionada a la proteína gIII del fago producida como se describe en el ejemplo 12) para inocular 10 ml de 2x TY (que contiene 10  $\mu$ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa), y luego el cultivo se incubó con agitación a 37 °C durante la noche (16 horas). Se usaron 50  $\mu$ l del cultivo de toda la noche para inocular 10 ml de 2x TY (que contenía 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 2% de glucosa), y después el cultivo se incubó con agitación a 37 °C hasta  $DO_{600nm} = 0.8$ . Se agregó el fago auxiliar HYPERPHAGE al cultivo hasta la concentración final de  $5 \times 10^9$  ufp/ml. Después el cultivo se incubó a 37 °C de forma estacionaria durante 30 minutos y luego con agitación a 200 rpm durante otros 30 minutos. Después el medio del cultivo anterior se llevó hasta 50 ml con 2x TY (que contenía 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 25  $\mu$ g/ml de kanamicina), luego el cultivo se incubó a 25 °C con agitación a 250 rpm durante 36 a 48 horas. A continuación el cultivo se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.45  $\mu$ m y se almacenó a 4 °C para la concentración posterior. Después el sobrenadante se concentró por precipitación con PEG y se resuspendió en PBS al 10% del volumen original almacenado.

45 Ejemplo 14 - Detección de TCR NY ESO heterodimérico funcional que contiene un enlace disulfuro intercatenario no nativo en partículas de fago filamentosos

Se detectó la presencia de TCR NY-ESO funcional (unión HLA-A2-NY-ESO) presentado en partículas fágicas en la suspensión concentrada preparada en el ejemplo 13 usando los métodos fago-ELISA descritos en el ejemplo 4. La figura 20 muestra la unión específica de las partículas fágicas que presentan TCR NY-ESO con HLA-A2-NY-ESO en un ensayo fago-ELISA.

Ejemplo 15 - Construcción de plásmidos para expresión celular de los genes de HLA-DRA.

55 Las secuencias de ADN que codifican la porción extracelular de las cadenas de HLA-DRA se amplifican a partir de ADNc aislado de la sangre de un sujeto humano sano, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con pares de cebadores de ADN sintéticos diseñados para incluir un sitio de restricción Bgl II.

Después se usó mutagénesis por PCR para agregar ADN que codifica la cremallera de leucina de Fos al extremo 3' de la secuencia amplificada.

60 Las manipulaciones de ADN y la clonación descritas antes se llevan a cabo como se describe en Sambrook, J et al, (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE.UU.

La figura 21 proporciona la secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  de HLA-DR lista para su inserción en el vector de

expresión bicistrónico. Esta figura indica la posición de los codones que codifican el péptido de la cremallera de leucina de Fos y el marcador (tag) de biotilación.

5 La numeración de aminoácidos se basa en la secuencia de ratón (Kabat, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, US Dept of Health & Human Services, Public Health Service, NIH, Bethesda, MD 1-1137)

10 Esta secuencia de ADN se inserta después en un vector de baculovirus bicistrónico pAcAB3 (véase la figura 22 por la secuencia de este vector) junto con el ADN que codifica la cadena  $\beta$  de HLA de clase II correspondiente, para su expresión en células de insecto Sf9. Este vector se puede utilizar para expresar cualquier complejo HLA-péptido de clase II en células de insecto.

Ejemplo 16. Construcción de plásmidos para la expresión celular de HLA-DRB de tipo silvestre y genes mutantes.

15 Las secuencias de ADN que codifican la porción extracelular de las cadenas de HLA-DRB se amplifican a partir de ADNc aislado de la sangre de un sujeto humano sano, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con pares de cebadores de ADN sintéticos diseñados para incluir un sitio de restricción BamH1.

20 Después se usó mutagénesis por PCR para agregar ADN que codifica la cremallera de leucina de Jun al extremo 3' de la secuencia amplificada y el ADN que codifica el péptido HA de la gripe cargado por la molécula HLA-DR1 al extremo 5' de la secuencia.

25 Las manipulaciones de ADN y la clonación descritas antes se llevan a cabo como se describe en Sambrook, J et al, (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE.UU.

La figura 23 proporciona la secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  de HLA-DR lista para su inserción en el vector de expresión bicistrónico. Esta figura indica la posición de los codones que codifican el péptido de la cremallera de leucina de Jun y el péptido HA de la gripe.

30 La numeración de aminoácidos se basa en la secuencia de ratón (Kabat, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, US Dept of Health #38; Human Services, Public Health Service, NIH, Bethesda, MD 1-1137)

35 Esta secuencia de ADN se inserta después en un vector de baculovirus bicistrónico pAcAB3 (véase la figura 22 por la secuencia de este vector) junto con el ADN que codifica la cadena  $\alpha$  de clase II correspondiente, para su expresión en células de insecto Sf9. Este vector se puede utilizar para expresar cualquier complejo HLA-péptido de clase II en células de insecto.

40 Ejemplo 17 Expresión y plegamiento de complejos HLA-DR1-HA de la gripe clase II .

45 La expresión de MHC de clase II se lleva a cabo utilizando los vectores de expresión bicistrónicos producidos como se describe en los ejemplos 15 y 16 que contienen las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de HLA-DR1 clase II y el péptido HA de la gripe. Los métodos de expresión y purificación utilizados son como se describe en (Gauthier (1998) PNAS EE.UU ] p 11828-11833). En resumen, HLA-DR1 soluble se expresa en el sistema de baculovirus reemplazando las regiones transmembrana hidrófobas y los segmentos citoplasmáticos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de DR con dominios de dimerización de cremallera de leucina de los factores de transcripción Fos y Jun. En el constructo de expresión, la secuencia del péptido HA de la gripe cargado en MHC de la clase requerida se une covalentemente al extremo N terminal de la cadena  $\beta$  de DR madura y la cadena  $\alpha$  de DR contiene una secuencia marcadora de biotilación para facilitar la formación del ligando bifuncional utilizando la metodología de multimerización de biotina / estreptavidina.

50 La proteína recombinante es secretada por células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante y purificada por cromatografía de afinidad. La proteína se purifica adicionalmente por HPLC de intercambio aniónico.

Ejemplo 18 - Constructo de moléculas péptido-HLA solubles de clase I

55 Con el fin de investigar más a fondo la especificidad del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad se produjeron las moléculas de HLA-péptido clase I solubles siguientes:

60 HLA-A2 - péptido (LLGRNSFEV) (SEQ ID 23)  
 HLA-A2 - péptido (KLVALGINAV) (SEQ ID 24)  
 HLA-A2 - péptido (LLGDLFGV) (SEQ ID 25)  
 HLA-B8 - péptido (FLRGRAYGL) (SEQ ID 26)  
 HLA-B27 - péptido (HRCQAIRKK) (SEQ ID 27)  
 HLA - Cw6 -péptido (YRSGIIAVV) (SEQ ID 28)  
 HLA-A24 - péptido (VYGFVRACL) (SEQ ID 29)

HLA-A2 - péptido (ILAKFLHWL) (SEQ ID 30)  
 HLA-A2 - péptido (LTLGEFLKL) (SEQ ID 31)  
 HLA-A2 - péptido (GILGFVFTL) (SEQ ID 33)  
 HLA-A2 - péptido (SLYNTVATL) (SEQ ID 34)

5

Estos péptidos -HLA solubles se produjeron utilizando los métodos descritos en el ejemplo 10.

Ejemplo 19 - Medición por resonancia de plasmones superficiales BIAcore de la especificidad de unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad al péptido-HLA.

10

Se usó un biosensor de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore 3000™) para analizar la especificidad de unión del clon 134 de TCR A6. (véanse las figuras 15a y 15b por las secuencias completas de ADN y aminoácidos de la cadena β mutada de TCR, respectivamente) Se llevó a cabo utilizando HLA-DR1-péptido de clase II, producido como se describe en los ejemplos 15 -17 y los complejos péptido-HLA de clase I indicados en el ejemplo 18, producidos utilizando los métodos detallados en el ejemplo 10. La tabla siguiente presenta los complejos péptido-HLA utilizados:

15

1. HLA-A2 - péptido (LLGRNSFEV) (SEQ ID 23)
2. HLA-A2 - péptido (KLVALGINAV) (SEQ ID 24)
3. HLA-A2 - péptido (LLGDLFGV) (SEQ ID 25)
4. HLA-B8 - péptido (FLRGRAYGL) (SEQ ID 26)
5. HLA-B27 - péptido (HRCQAIRKK) (SEQ ID 27)
6. HLA - Cw6 -péptido (YRSGIIAVV) (SEQ ID 28)
7. HLA-A24 - péptido (VYGFVRACL) (SEQ ID 29)
8. HLA-A2 - péptido (ILAKFLHWL) (SEQ ID 30)
9. HLA-A2 - péptido (LTLGEFLKL) (SEQ ID 31)
10. HLA-DR1-péptido (PKYVKQNTLKLA) (SEQ ID 32)
11. HLA-A2 - péptido (GILGFVFTL) (SEQ ID 33)
12. HLA-A2 - péptido (SLYNTVATL) (SEQ ID 34)

20

25

30

Los péptidos HLA anteriores se inmovilizaron en las superficies de unión recubiertas de estreptavidina en las celdas de flujo de un BIAcore 3000™ de manera semiorientada.

35

El BIAcore 3000™ permite analizar la unión del receptor de linfocitos T soluble hasta con cuatro pMHC diferentes (inmovilizados en celdas de flujo diferentes) simultáneamente. Para este experimento se inmovilizaron tres HLA-péptidos diferentes en las celdas de flujo 2-4 y 1 celda de flujo se dejó en blanco como control. La inyección manual de complejos HLA-péptido permitió la manipulación del nivel exacto de moléculas inmovilizadas.

40

Después que se hubo evaluado la capacidad del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad para unirse a los 3 primeros complejos HLA-péptido de la lista anterior los siguientes tres se inmovilizaron en estas celdas de flujo directamente encima de los anteriores. Este proceso se continuó hasta que se hubo evaluado la unión del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad a los 12 complejos HLA-péptido.

45

Diez inyecciones de 5 µl de clon 134 de TCR A6 de alta afinidad se pasaron sobre cada celda de flujo a 5 µl/min en concentraciones que van desde 4.1 ng/ml a 2.1 mg/ml. (Véanse Figuras 24-28)  
 Como control final el clon 134 de TCR A6 de alta afinidad se pasó sobre una celda de flujo que contenía HLA-A2 Tax inmovilizado (LLFGYPVYV) (SEQ ID 21), el ligando análogo para este TCR.

50

La unión específica del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad sólo se observó con su ligando análogo. (HLA-A2 Tax (LLFGYPVYV) (SEQ ID 21)) Estos datos demuestran además la especificidad del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad. (Véanse Figuras 24-28)

Ejemplo 20 - Mutagénesis de las regiones CDR3 de TCR NY ESO

55

Las regiones CDR3 de TCR NY-ESO fueron destinadas a la introducción de mutaciones para investigar la posibilidad de generar mutantes de alta afinidad. Esto se logró utilizando cebadores de PCR específicos para TCR NY-ESO en combinación con métodos sustancialmente similares a los que se detallan en el ejemplo 7.

60

Ejemplo 21 - Aislamiento de mutantes de TCR A6 de alta afinidad

El aislamiento de mutantes de TCR NY-ESO de alta afinidad se llevó a cabo por el primero de los dos métodos descritos en el ejemplo 8.

Se identificó un único mutante de TCR NY-ESO de alta afinidad.

Ejemplo 22 - Producción de TCR NY-ESO heterodimérico de alta afinidad soluble con enlace disulfuro no nativo entre las regiones constantes, que contiene mutaciones en la región variable

5 Se aisló el ADN del fagómido que codifica el mutante de TCR NY-ESO de alta afinidad identificado en el ejemplo 21 de células de E. coli pertinentes utilizando un kit Mini-Prep (Quiagen, Reino Unido)

Se usaron amplificación por PCR utilizando el ADN del fagómido como diana y los cebadores siguientes para amplificar la secuencia de ADN de la región variable de la cadena β mutada de TCR NY-ESO soluble.

10 Cebador hacia delante de la cadena beta de NY-ESO  
Tctctcattaatgaatgctggtgtcactcagacccc (SEQ ID 145)  
(Sitio de restricción AseI está subrayado)

Cebador reverso universal de la cadena beta  
15 Tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtgg (SEQ ID 146)  
(Sitio de restricción AgeI está subrayado)

Después el producto de PCR se digirió con AgeI/AseI y se clonó en pEX821 (producido tal como se describe en el ejemplo 11) y se cortó con NdeI/AgeI.

20 La secuencia de ADN de la cadena β mutada de TCR NY-ESO amplificada como se describió antes, y la cadena α de TCR NY-ESO producida como se describe en el ejemplo 11 se usaron para producir un TCR NY-ESO de alta afinidad soluble como se describe en WO 03/020763. En resumen, las dos cadenas se expresan como cuerpos de inclusión en cultivos de E. coli separados. Después los cuerpos de inclusión se aíslan, desnaturalizan y se vuelven a plegar juntos in vitro.

25 Ejemplo 23 - Caracterización por resonancia de plasmones superficiales BIAcore de la unión de TCR NY ESO de alta afinidad con HLA-A2 Tax.

30 Se usó un biosensor de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore 3000™) para analizar la unión de TCR NY-ESO de alta afinidad con el ligando HLA-A2 NY-ESO. Esto se facilitó mediante la producción de complejos pMHC (como se describe en el ejemplo 10) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de manera semiorientada, permitiendo el análisis eficaz de la unión de un receptor de linfocitos T soluble con hasta cuatro pMHC diferentes (inmovilizados en celdas de flujo diferentes) simultáneamente. La inyección manual del complejo HLA permite manipular fácilmente el nivel exacto de moléculas clase I inmovilizadas.

35 Las interacciones entre TCR NY-ESO de alta afinidad que contiene un enlace intercatenario nuevo y el complejo HLA-A2 NY-ESO o una combinación de HLA-A2 Tax irrelevante, cuya producción se describe en el ejemplo 10, se analizaron en un biosensor de resonancia de plasmones superficiales (SPR) BIAcore 3000™, nuevamente como se describe en el ejemplo 10.

40 Se calculó que la kd para la interacción de NY-ESO de alta afinidad soluble con el HLA-A2 NY-ESO era en 4.1 μm, (véanse figuras 29a y 29b) que se comparan una kd de 15.7 μm para la interacción de tipo silvestre. (Véanse las figuras 30a y 30b)

45 Ejemplo 24 - Producción y análisis de otros TCR A6 de alta afinidad

Los TCR solubles que contienen las mutaciones siguientes correspondientes a los identificados en los clones 89, 1, 111 y 71 (véase el ejemplo 8) se produjeron utilizando los métodos detallados en el ejemplo 9. Después se evaluó la unión de estos TCR solubles con HLA-A2 Tax mediante el ensayo de Biacore detallado en el ejemplo 10.

Mutantes de la cadena β de TCR A6	
Clon	Secuencia de CDR3
Tipo silvestre	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEQ ID 83)
	A S R P G L A G G R P E Q Y (SEQ ID 84)
89	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCAGAGGATTAG (SEQ ID 91)
	A S R P G L A G G R P E D X (SEQ ID 92)
1	GCCTCGAGGCCGGGGCTGTTCCGGGGCGACCAGAGCAGTAG (SEQ ID 97)
	A S R P G L V P G R P E Q X (SEQ ID 98)
III	GCCTCGAGGCCGGGACTAGCGGGAGGGCGACCACATCCGTAG (SEQ ID 101)

Mutantes de la cadena $\beta$ de TCR A6	
Clon	Secuencia de CDR3
	A S R P G L A G G R P H P X (SEQ ID 102)
Mutantes de la cadena $\alpha$ de TCR A6	
Clon	CDR3
Tipo silvestre	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAAGCTTCAG (SEQ ID 107)
	A V T T D S W G K L Q (SEQ ID 108)
71	GCCGTTACAAGTACAGCTGGGGGAGCTTCAT (SEQ ID 117)
	A V T T D S W G E L H (SEQ ID 118)

Mutaciones combinadas utilizadas como base para la producción de TCR A6 mutados solubles:

- 5 Mutaciones del clon 89 + mutaciones del clon 134
- Mutaciones del clon 71 + mutaciones del clon 134
- Mutaciones del clon 71 + mutaciones del clon 89
- Mutaciones del clon 1 +  $\beta$ G102→Mutación A

Resultados:

10 La tabla siguiente compara la afinidad por HLA-A2 Tax de los TCR A6 mutados solubles anteriores con la obtenida utilizando un TCR A6 soluble que contiene regiones variables sin mutar. Tenga en cuenta que la afinidad de los mutantes de más alta afinidad se expresa como la vida media para la interacción. ( $T_{1/2}$ ) Estos TCR A6 mutados solubles mostraron mayor afinidad por HLA-A2 Tax que el TCR A6 sin mutar soluble como lo demuestra su menor  $k_d$  o mayor  $T_{1/2}$  para la interacción.

15 Las figuras 31-37 muestran las huellas Biacore utilizadas para calcular la afinidad por HLA-A2 Tax de estos TCR mutados solubles. Las figuras 38a-e muestran la secuencia de aminoácidos de las cadenas mutadas de TCR A6.

TCR A6	Kd ( $\mu$ M).	$T_{1/2}$ (s)
Tipo silvestre	1.9	7
Clon 1		810
Clon 89	0.41	
Clon 111	1.18	
Clon 71	1.37	
Clon 89 + mutaciones del clon 134		114 (fase 1) 4500 (fase 2)
Clon 71 + mutaciones del clon 134		882
Clon 71 + mutaciones del clon 89	0.35	
Clon 1 + $\beta$ G102→Mutación A		738

20 Ejemplo 25 - Tinción de células utilizando monómeros y tetrámeros de TCR A6 de alta afinidad

25 Se incubaron células que presentan el antígeno T2 con  $\beta$ 2m (3  $\mu$ g/ml) se pulsaron con péptido Tax a un rango de concentraciones ( $10^{-5}$  -  $10^{-9}$  M) durante 90 minutos a 37 °C. Controles, que también utilizan linfocitos T2 incubados con  $\beta$ 2m (3  $\mu$ g/ml), se pulsaron con el péptido de la gripe  $10^{-5}$  M o se incubaron sin péptido (sin pulsar). Después de pulsar las células se lavaron en RPMI exento de suero y se incubaron  $2 \times 10^5$  células con tetrámeros del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad unido a estreptavidina marcado con ficoeritrina (PE). (Molecular probes, los Países Bajos) (10  $\mu$ g/ml) o con monómeros del clon 134 de TCR A6 de alta afinidad marcados con Alexa 488 (Molecular probes, los Países Bajos) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células, se examinó la unión de los tetrámeros de y monómeros de TCR marcados por citometría de flujo utilizando un FACSVantage SE (Becton Dickinson).

Resultados

Como se ilustra en la figura 39a la tinción específica de los linfocitos T2 por tetrámeros de TCR A6 de alta afinidad se pudo observar a concentraciones de péptido Tax de hasta  $10^{-9}$  M.

5

Como se ilustra en la figura 39b la tinción específica de los linfocitos T2 por monómeros de TCR A6 de alta afinidad se pudo observar a concentraciones de péptido Tax de hasta  $10^{-8}$  M.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una partícula fágica que presenta en su superficie un par de polipéptidos de los receptores de linfocitos T diméricos (dTCR), donde dicho par de polipéptidos de dTCR está constituido por un primer polipéptido en el cual una secuencia del dominio variable de la cadena  $\alpha$  o  $\delta$  de TCR se fusiona al extremo N terminal de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\alpha$  de TCR y un segundo polipéptido donde una secuencia del dominio variable de la cadena  $\beta$  o  $\gamma$  de TCR se fusiona al extremo N terminal de una secuencia extracelular del dominio constante de la cadena  $\beta$  de TCR; donde el primer y segundo polipéptidos están unidos por un enlace disulfuro que corresponde al enlace disulfuro intercatenario nativo presente en los TCR  $\alpha\beta$  diméricos nativos.
- 10 2. Una partícula fágica como la que se reivindica en la reivindicación 1 que es una partícula de un fago filamentos.
- 15 3. Una partícula fágica como la que se reivindica en la reivindicación 1 o 2 donde el extremo C-terminal de un miembro del par de polipéptidos de dTCR está unida por un enlace peptídico a un residuo expuesto en la superficie de la partícula fágica.
- 20 4. Una colección variada de partículas fágicas como la que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 5. Una colección variada como la que se reivindica en la reivindicación 4 donde la variación reside en los dominios variables del par de polipéptidos de dTCR .
- 30 6. Un método para la identificación de los TCR con una característica específica, donde dicho método comprende someter una colección variada de TCR presentados en partículas fágicas según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5 a un proceso de selección que selecciona en función de dicha característica, y aislar las partículas fágicas que presentan un TCR con dicha característica, y opcionalmente a un proceso de amplificación para multiplicar las partículas aisladas, y/o a un proceso de cribado que mide dicha característica, identificando esas partículas fágicas que presentan un TCR con la característica deseada y aislando esas partículas fágicas, y opcionalmente a un proceso de amplificación para multiplicar las partículas aisladas.
7. Un método como el que se reivindica en la reivindicación 6 donde la característica específica es mayor afinidad por un ligando de TCR.

**Figura 1a**

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtgttccagagggagccatt  
gcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggtacaga  
caatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatgggtgacaaa  
gaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctc  
atcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgcccgttacaactgac  
agctgggggaaattgcagtttggagcagggaccaggttgtgggtcaccccagatatac  
cagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagctct  
gtctgcctattcacccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaaagtaaggattct  
gatgtgtatatacagacaaaatgtgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagc  
aacagtgctgtggcctggagcaacaaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaac  
aacagcattattccagaagacaccttcttcccagcccagaaagttcctaa

(SEQ ID 147)

**Figura 1b**

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc  
atgacactgcagtggtgccagggatataaaccatgaatacatgtcctgggtatcgacaa  
gacccagggcatggggctgagggctgattcattactcagttgggtgctgggtatcactgac  
caaggagaagtccccaatgggtacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg  
ctcaggctgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg  
ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtagtctcgggcccgggcaccaggctcacg  
gtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca  
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggcttc  
taccccgaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg  
gtctgcacagaccccgagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatatac  
gctctgagcagccgctgagggctctcgccaccttctggcaggacccccgcaaccac  
ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtgagaccaggtat  
agggccaaaaccgtaaccagatcgtcagcgcgaggcctggggtagagcagactaa

(SEQ ID 148)

**Figura 2a**

MQ  
 KEVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY  
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF  
 GAGTQVVVTP DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS  
 DVYITDKCVL DMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS  
 PESS\*  
 (SEQ ID 149)

**Figura 2b**

M  
 NAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV  
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF CASRPGLAGG  
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG  
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VCTDPQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT  
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD\*  
 (SEQ ID 150)

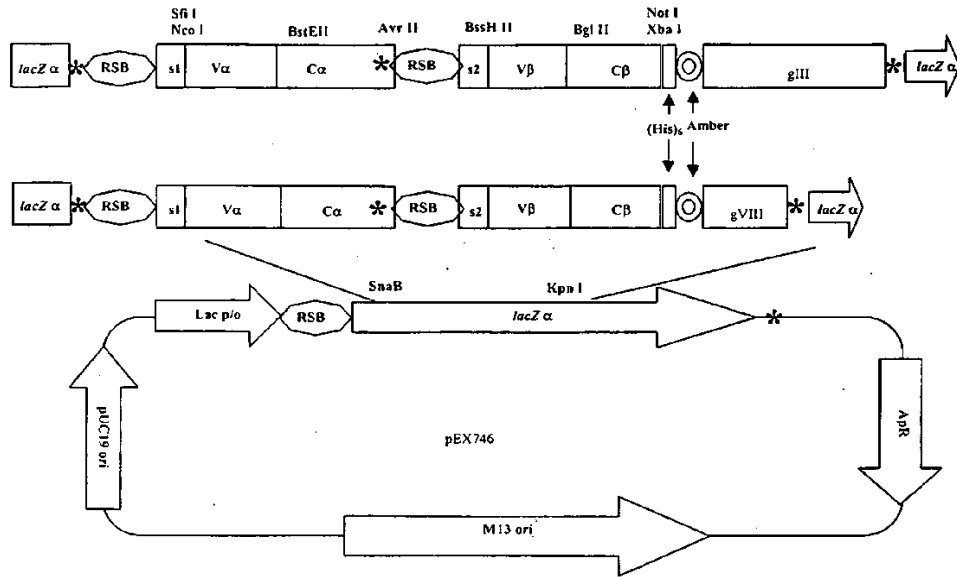


Figura 3

```

1  gttaactacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcmc ggaacccta ttgtttatt
61  ttttcaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca
121 ataataatga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcggcc ttattccctt
181 ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga
241 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa
301 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttctccaatg atgagcactt ttaaagtctt
361 gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcccat
421 acactattct cagaatgact tgggtgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga
481 tggcatgaca gtaagagaat tatgcaagtgc tgccataacc atgagtata acactgccc
541 caactactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt tgcacaacat
601 ggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa
661 cgacgagcgt gacaccacga tgccgttagc aatggcaaca acggtgcca aactattaac
721 tggcgaacta cttactctag cttcccgcca cttcccgcca gactggatgg agcgggataa
781 agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc
841 tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atgtaagcc
901 acagatcgct gtagttagct acacgacggg gactcaggca actatggatg aacgaaatag
961 acagatcgct gtagttagct acacgacggg gactcaggca actatggatg aacgaaatag
1021 ctcataata ctttagattg atttaccctg gttgataatc agaaaagccc caaaaacagg
1081 aagattgtag aagcaaatat ttaaattgta aacgtaata tttgttaaa attcgcgcta
1141 aatttttggt aaatcagctc attttttaac caataggccc aaatcggcaa aatcccttat
1201 aaatcaaaag aatagcccga gatagggttg agtgtgttcc cagtttggaa caagagtcca
1261 ctattaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa cctctatca gggcgatggc
1321 ccactacgtg aaccatcacc caaatcaagt tttttggggt cgaggtgccc taaagcacta
1381 aatcgggaacc ctaaagggag ccccagattt agagcttgac ggggaaagcg aacgtggcga
1441 gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcggcca
1501 cgctgcgctg aaccaccaca cccgcgcgcc ttaatgcgcc gctacagggc gctaaaagg
1561 atctagggtg agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagtttctg
1621 ttcactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tcttttttt
1681 ctgcccgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgtt ggtttggttg
1741 ccggatcaag agctaccaac tctttttccc aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata
1801 ccaaatactg ttcttctagt ttgagccctg ttaggccacc actcaagaa cctctgtagc
1861 ccgctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag
1921 tctgtcttta cccgggttga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgcga ggggtcgggc
1981 tgaacggggg gttcgtgac acagcccagc ttggagcga cgaactacac cgaactgaga
2041 tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg aaggagaaa ggcggcagg
2101 tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc aggggaaac
2161 gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggtt cgccacctct gacttgagcg tctgattttt
2221 tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaaaccca gcaacgcggc ctttttacgg
2281 ttcctggcct tttgctggcc ttttgcctac atgtaatgtg agttagctca ctcataggc
2341 acccaggctt ttacacttta tgcttccggc tctgtatgtt tgtggaattg tgagcggata
2401 acaatttcac acaggaaca gctatgacca tgattacgcc aagctacgta taataatatt
2461 ctatttcaag gagacagtca taatgaaata cctattgctt acggcagccg ctggattggt
2521 attactcgcg gccagccgg ccattggccc gaaggaaagt gagcagaact ctggaccctt
2581 cagtgctcca gagggagcca ttgcctctct caactgcact tacagtgacc gaggttccca
2641 gtccttcttc tggtagacag aatattctgg gaaaagccct gagttgataa gttccatata
2701 ctccaatggt gacaaagaag atggaagggt tacagcacag ctcaataaag ccagccagta
2761 tgtttctctg ctcatcagag actcccagcc cagtgatcca gccacctacc tctgtgccc
2821 tacaactgac agctggggga aatgcaagt tggagcaggg acccagggtt tggtcacccc
2881 agataccag aaccctgacc ctgcccgtga ccagctgaga gactctaat ccagtgacaa
2941 gtctgtctgc ctattcaccg attttgatt tcaaacaaat gtgtcacaaa gtaaggattc
3001 tgatgtgtat atcacagaca aatgtgtgct agacatgagg tctatggact tcaagagcaa
3061 cagtgctgtg gcctggagca acaaatctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaacaacag
3121 cattattcca gaagacacct ctttcccag cccagaaagt tcctaataac ctaggttaat
3181 taagaattct ttaagaagga gatatacata tgaaaaaatt attatcgcga attccttag
3241 ttgttccctt ctattctcac agcgcgagc ctggtgtcac tcagaccca aaattccagg
3301 cctgaagac aggaagagc atgacactgc agtgtgcccc ggatatgaac catgaataca
3361 tgtcctggta tcgacaagac ccaggcatgg ggctgaggct gattcattac tcagttgggtg

```

Figura 4

ES 2 451 691 T3

3421 ctggtatcac tgaccaagga gaagtcccca atggctacaa tgtctccaga tcaaccacag  
 3481 aggatattccc gctcaggctg ctgtcggctg ctccctccca gacatctgtg tacttctgtg  
 3541 ccagcaggcc gggactagcg ggagggcgac cagagcagta cttcgggccc ggaccaggcc  
 3601 tcacggtcac agaggacctg aaaaaactgt tcccaccgga ggtcgtctgtg tttgagccat  
 3661 cagaagcaga gatctcccac acccaaaaagg ccaactctgtg gtgcctggcc acaggcttct  
 3721 accccgacca cgtggagctg agctgggtggg tgaatgggaa ggaggtgcac agtggggctc  
 3781 gcacagacct gcagcccctc aaggagcagc ccgccctcaa tgactccaga tacgctctga  
 3841 gcagccgctt gagggctctg gccaccttct ggcaggacct ccgcaaccac ttccgctgtc  
 3901 aagtccagtt ctacgggctc tcgggagaat acgagtggac ccaggatagg gccaaaaccg  
 3961 tcaccagat cgtcagcgcc gaggcctggg gtagagcaga cgcggccgca tctagacatc  
 4021 atcaccatca tctactagact gttgaaagtt gtttagcaaa accccataca gaaaattcat  
 4081 ttactaacgt ctggaaagac gacaaaactt tagatcgta cgtaactat gagggttgtc  
 4141 tgtggaatgc tacaggcggt gtagtttgta ctggtgacga aactcagtg tactggatcat  
 4201 gggttcctat tgggtctgct atccctgaaa atgaggggtg tggctctgag ggtggcgggt  
 4261 ctgagggctg cggttctgag ggtggcggta ctaaacctcc tgagtacggg gatacaccta  
 4321 ttccgggcta tacttatatc aaccctctcg acggcactta tccgctgggt actgagcaaa  
 4381 accccgctaa tcctaactct tctcttgagg agtctcagcc tcttaactat tcatgtttc  
 4441 agaataatag gttccgaaat aggcaggggg cattaactgt ttatacgggc actgttactc  
 4501 aaggcaactga ccccgtaaaa acttattacc agtacactcc tgtatcatca aaagccatgt  
 4561 atgacgctta ctggaacggg aaattcagag actgcgcttt ccattctggc tttaatgagg  
 4621 atccattcgt ttgtgaatat caaggccaat cgtctgacct gcctcaacct cctgtcaatg  
 4681 ctggcggcgg ctctgggtgg ggttctgggt gcggctctga ggggtggggc tctgaggggtg  
 4741 gcggttctga ggtggcggc tctgagggag gcggttccgg tgggtggctct ggttccgggtg  
 4801 attttgatta tgaaaagatg gcaaacgcta ataaaggggc tatgaccgaa aatgccgatg  
 4861 aaaacgcgct acagtctgac gctaaaaggca aacttgattc tgtcgtact gat tacgggtg  
 4921 ctgctatcga tgggttctatt ggtgacggtt ccggccttgc taatggtaat ggtgctactg  
 4981 gtgattttgc tggctctaat tcccaaatgg ctcaagtcgg tgacgggtgat aatcacctt  
 5041 taatgaataa tttccgctca tatttacctt ccctccctca atcggttgaa tgtcgcctt  
 5101 ttgtcttttag cgctggtaaa ccataatgaat tttctattga ttgtgacaaa ataaacttat  
 5161 tccgtgggtg ctttgcgctt cttttatag ttgccacctt tatgtatgta ttttctacgt  
 5221 ttgctaacat actgcgtaat aaggagctct aataaggtac cctctagtca aggcctatag  
 5281 tgagtcgtat tacggactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt  
 5341 tacccaactt aatcgecttg cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga  
 5401 ggcccgacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgctctgc  
 5461 ttgtaataaa agcccgcctc ggcgggcttt ttttt

(SEQ ID 151)

**Figura 5**

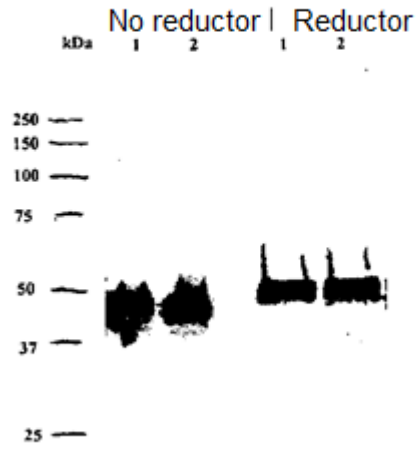
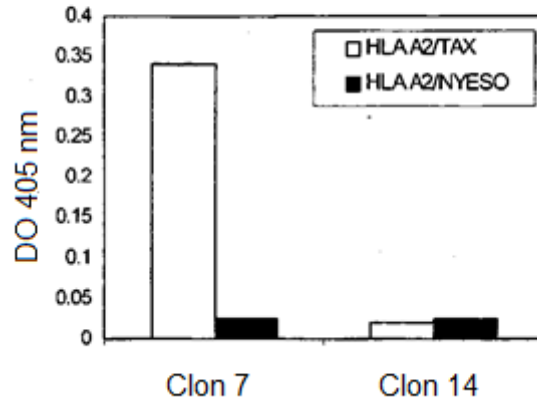


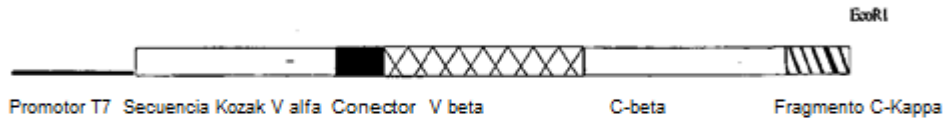
Figura 6





**Figura 7a**

Diagrama esquemático del constructo de presentación en ribosoma A6 scTCR-C-Kappa



**Figura 7b**

```

agctgcagct aatacagactc actataggaa caggccacca tgggcccagaa
ggaagtggag cagaactctg gacccctcag tgttccagag ggagccattg
cctctctcaa ctgcaacttac agtgaccgag gttcccagtc cttcttctgg
tacagacaat attctgggaa aagcctgag ttgataatgt ccatatactc
caatggtgac aaagaagatg gaaggttac agcacagctc aataaagcca
gccagtatgt ttctctgctc atcagagact cccagcccag tgattcagcc
acctacctct gtgccgttac aactgacagc tgggggaaat tgcagtttg
agcagggacc caggttgtgg tcaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg
gatccggcgg tggcgggtcg aacgctggtg tcactcagac cccaaaatc
caggtcctga agacaggaca gagcatgaca ctgcagtgtg cccaggatat
gaacctgaa tacatgtcct ggtatcgaca agacceaggc atggggctga
ggctgattca ttactcagtt ggtgetggtg tcactgacca aggagaagtc
cccaatggct acaatgtctc cagatcaacc acagaggatt tcccgtcag
gctgctgtcg gctgctccct cccagacatc tgtgtacttc tgtgccagea
ggccgggact agcgggaggg cgaccagagc agtacttctgg gccgggcacc
aggctcacgg tcacagagga cctgaaaaac gtgttcccac ccgaggtctc
tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccacac
tggtgtgctt ggccacagge ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg
tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcacag acccgagcc
cctcaaggag cagcccgcct tcaatgactc cagatacgtc ctgagcagcc
gcctgagggg ctcgccacc ttctggcagg acccccgaa caettctcge
tgtcaagtcc agttctacgg geteteggag aatgacgagt ggaccagga
tagggccaaa cccgtcacc agategtcag cgcagagcc tggggtagag
cagacggtgg aggcggttca ctcageagca ccctgacgt gagcaaaagca
    
```

gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct  
gagttcgccc gtcacaaaaga gcttcaaccg cggagagtca taagaattct  
cag

(SEQ ID 152)

Figura 7C

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

(SEQ ID: 153)

## Figura 8

## Secuencia pUC19-T7

```

1 ctgctttccc ggagcactat gcggataaaa atatccaatt acagtactat tattaccaa gaatctgcag
71 tccaccgtga aaagcccctt tacacgcgcc ttggggataa acaaataaaa agatttatgt aagtttatac
141 ataggcgagt actctgttat tgggactatt tacgaagtta ttataacttt tccttctca tactcataag
211 ttgtaaaggc acagcgggaa taagggaaaa aacgcggtaa aacggaagga caaaaacgag tgggtctttg
281 cgaccacttt cattttctac gacttctagt caaccacgt gctcacccaa tgtagcttga cctagagttg
351 tcgccattct aggaactctc aaaagcgggg cttcttgcaa aaggttacta ctcgtgaaaa tttcaagacg
421 atacaccgcg ccataatagg gcataaactgc ggeccgttct cgttgagcca gcggcgtatg tgataagagt
491 cttactgaac caactcatga gtggtcagtg tcttttcgta gaatgcctac cgtactgtea ttctctaat
561 acgtcacgac ggtattggta ctactattg tgacgcgggt tgaatgaaga ctggtgctag cctcctggct
631 tcctcgattg gcgaaaaaac gtgttgtagc ccctagtaca ttgagcggaa ctagcaacc tggcctcga
701 cttacttcgg tatggtttgc tgctcgcact gtggtgctac ggacatcgtt accggtgttg caacgcgtt
771 gataattgac cgcttgatga atgagatcga agggccgttg ttaattatct gacctacctc cgcctattc
841 aacgtcctgg tgaagacgcg agccgggaag gccgaccgac caataacga ctatthagac ctcgccact
911 cgcaccaga gcgccatagt aacgtcgtga ccccggtcta ccattcggga gggcatagca tcaatagatg
981 tgctgccct cagtccggtg atacctactt gctttatctg tctagcgact ctatccacg agtgactaat
1051 tcgtaacct tgacagtctg gttcaaatga gtatatatga aatctaacta aattttgaag taaaaattaa
1121 attttctag atccacttct aggaaaaact attagagtac tggttttagg gaattgcact caaaagcaag
1191 gtgactcgca gtctggggca tcttttctag ttctctagaa gaactctagg aaaaaagac gcgcattaga
1261 cgacgaacgt ttgtttttt ggtggcgatg gtccgccacca aacaaaacggc ctagtctcgc atggttgaga
1331 aaaaggcttc cattgaccga agtcgtctcg cgtctatggt ttatgacagg aagatcacat cggcatcaat
1401 ccggtggtga agttcttgag acatcgtggc ggatgtatgg agcagagcga ttaggacaat ggtcaccgac
1471 gacggtcacc gctattcagc acagaatggc ccaacctgag tctgctatc aatggectat tccgcgtcgc
1541 cagcccgact tgcccccaa gcacgtgtgt gcacgtgtgt gaagggcttc cctctttccg cctgtccata ggccattcgc
1611 gatgtcgcac tcgatactct ttcgcgggtgc gaagggcttc cctctttccg cctgtccata ggccattcgc
1681 cgtcccagcc ttgtcctctc gcgtgctccc tcgaaggtcc ccttttgcgg accatagaaa tatcaggaca
1751 gcccaaacg gtggagactg aactcgcagc taaaaaact acgagcagtc cccccgctc ggatacctt
1821 ttgcggtcgt tgcgcggaa aaatgccaa gaccggaaaa cgaccggaaa acgagtgtac aagaaaggac
1891 gcaatagggg actaagacac ctattggcat aatggcggaa actcactcga ctatggcag cgcgtcggc
1961 ttgctggctc gcgtcgctca gtcactcgtt ccttcgcctt ctgcggggtt atgcgtttgg cggagagggg
2031 cgcgcaaccg gctaaagtaac tacgtcgacc gtgctgtcca aagggtgac ctttcgccc tcaactcgcgt
2101 tgcgttaatt acaactcaatc gagttagtaa tccgtggggt ccgaaatgtg aaatacgaag gccgagcata
2171 caacacacct taacactcgc ctattgttaa agtgtgtcct ttgtcgatac tggtaactaa gcggttcgac
2241 gtcgatfatg ctgagtgata tcttctcgcg tgggtaccct aggggcccat ggctcgagct taagtaccg
2311 gcagcaaat gttgcagcac tgaccctttt gggaccgcaa tgggttgaat tagcggaaacg tcgtgtaggg
2381 ggaaagcggc cgaccgcatt atcgtttctc cgggcgtggc tagcgggaag ggttgtcaac gcgtcggact
2451 taccgcttac cgcggactac gccataaaaag aggaatgcgt agacacgcca taaagtgtgg cgtataccac
2521 gtgagagtca tgttagacga gactacggcg tatcaatcgc gtcggggctg tgggcgggtg tgggcgactg
2591 cgcgggactg cccgaacaga cgagggccgt aggcgaatgt ctgttcgaca ctggcagagg cctcgcactg
2661 acacagtctc caaaagtggc agtagtggct ttgcgcgt

```

(SEQ ID 154)

Figura 9

## A6 scTCR-C-kappa clonado en pUC19-T7

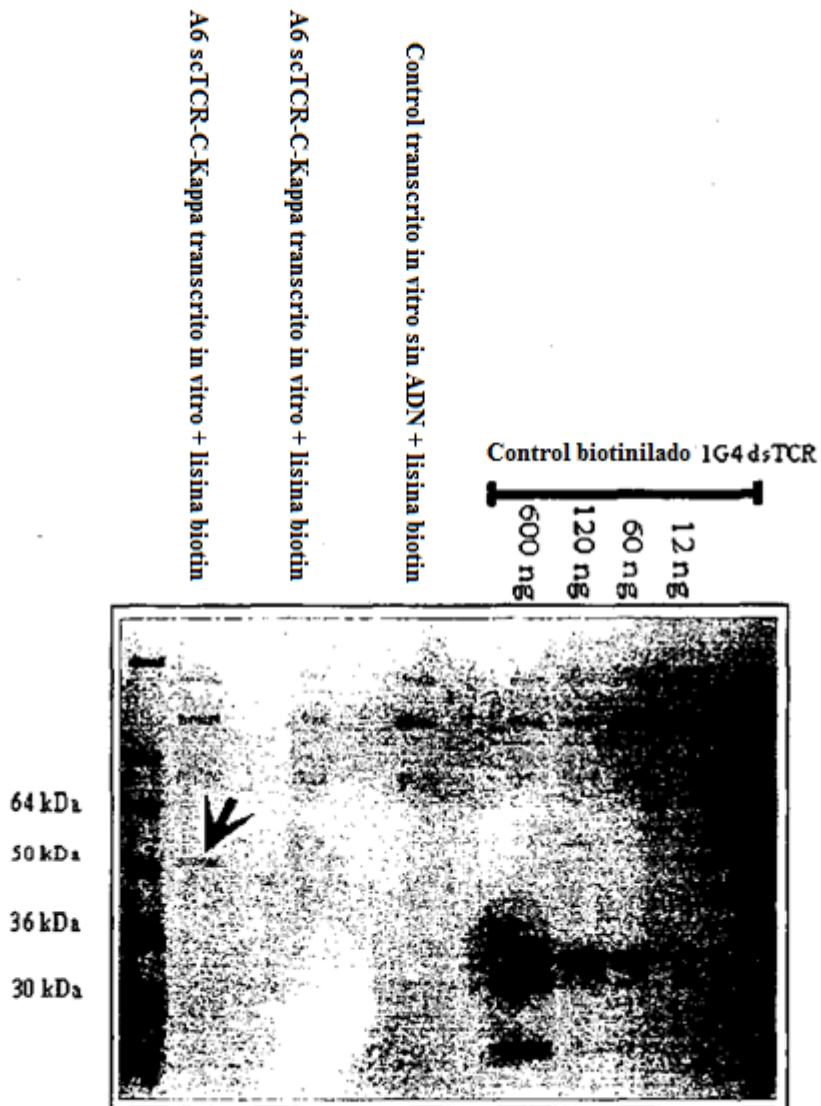
```

1  ccatggggcca gaaggaagtg gagcagaact ctggaccct cagtgttcca
51  gaggagacca ttgcctctct caactgcact tacagtgacc gaggttccca
101 gtccttcttc tggtagagac aatattctgg gaaaagccct gagttgataa
151 tgtccatata ctccaatggt gacaaagaag atggaagggt tacagcacag
201 ctcaataaaag ccagccagta tgtttctctg ctcatcagag actcccagcc
251 cagtgattca gccacctacc tctgtgccgt tacaactgac agctggggga
301 aattgcagtt tggagcaggg acccaggttg tggtcaccgg tggaggcggg
351 tcaggcggag gtggatccgg cgggtggcggg tcgaacgctg gtgtcactca
401 gaccccaaaa ttccaggtcc tgaagacagg acagagcatg aactgcagt
451 gtgccaggga tatgaacat gaatacatgt cctggtatcg acaagacca
501 ggcattggggc tgaggctgat tcattactca gttgggtgctg gtatcactga
551 ccaaggagaa gtccccaatg gctacaatgt ctccagatca accacagagg
601 atttcccctc caggctgctg tcggtgctc cctcccagac atctgtgtac
651 ttctgtgcca gcaggccggg actagcggga gggcgaccag agcagtactt
701 cgggcccgggc accaggctca cggtcacaga ggacctgaaa aacgtgttcc
751 caccggaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc
801 caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt
851 ggagctgagc tgggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca
901 cagaccgcga gccctcaag gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac
951 gctctgagca gccgcctgag ggtctcggcc accttctggc aggacccccg
1001 caaccacttc cgctgtcaag tccagtctta cgggctctcg gagaatgacg
1051 agtggaccca ggatagggcc aaaccctca cccagatcgt cagcgcagag
1101 gcctggggta gagcagacgg tggaggcggg tctactcagca gcaccctgac
1151 gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca
1201 cccatcaggg cctgagttcg cccgtcacia agagcttcaa ccgaggagag
1251 tcataagaat tc

```

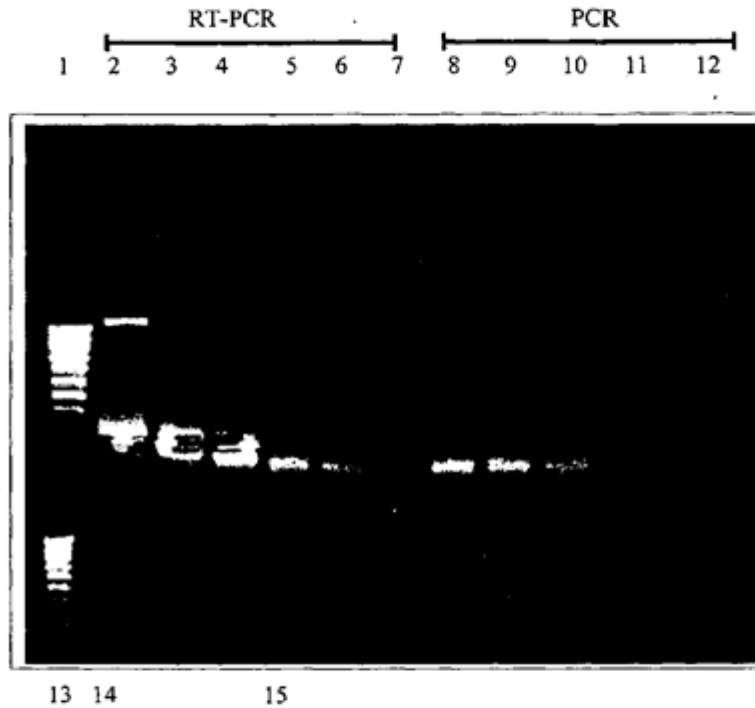
(SEQ ID 155)

Figura 10



La proteína A6 scTCR-C-Kappa se muestra en la inmunotransferencia tipo western anterior con una flecha

**Figura 11**



Carril 1 marcador de ADN Boline 100 bp  
 Carril 2 reacción de A6 scTCR-C-Kappa seleccionado contra perlas de HLA-A2 TAX  
 Carril 3 reacción de A6 scTCR-C-Kappa seleccionado contra perlas de HLA-A2 TAX en presencia de 10 microgramos de A6scTCR soluble  
 Carril 4 reacción de A6 scTCR-C-Kappa seleccionado contra perlas de control  
 Carril 5 reacción de control sin ADN seleccionado contra perlas de HLA-A2 TAX  
 Carril 6 reacción de control sin ADN seleccionado contra perlas de HLA-A2 TAX en presencia de 10 microgramos de A6scTCR soluble  
 Carril 7 reacción de control sin ADN seleccionado contra perlas de control  
 Carriles 8-12 y carril 13 son como los carriles 2-7 excepto que no se agregó transcriptasa inversa  
 Sólo taq de alta fidelidad de Roche. Estos son los controles de contaminación del ADN  
 Carril 13 control positivo de RT-PCR

**Figura 12a**

Secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  del clon 9 del TCR A6 mutado

gctgggtgctcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacagagcatgacactgcagtgctcccaggatgaacat  
 gaatacatgtcctgglatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttgggtgctggtatcactgaccaagga  
 gaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgtcaggctgctgctggctgctccctcccagacatct  
 gtgtactctgtgccagcaggccgggactagcgggagggtgaccagagcagtaactcggggccgggaccaggctcacggtcac  
 agaggacctgaaaaacgtgtccaccocaggctcgtglttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggcca  
 cactgggtgctcctggccacaggcttctaccccaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggagggtgcacagtgggg  
 tctgcacagaccocagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatagcctcagcagccgctgagggtctcgg  
 ccacctctggcaggaccccccaaccactccgctgtcaagtccagttctacgggctcctggagaatgacgagtgaggaccaggga  
 tagggccaaaccgctacccagatcgtcagcgcggagcctggggtagagcagac  
**(SEQ ID 156)**

**Figura 12b**

Secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta$  del clon 9 del TCR A6 mutado

AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVP  
 NGYVNSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGLAGGXPEQYFGPGTRLTVTEDLKNVF  
 PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA  
 LNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGR  
 AD  
**(SEQ ID 157)**

X = Indica la posición del aminoácido correspondiente al codón de parada 'ópalo' introducido, esto resultará generalmente en la sustitución de un residuo de triptofano (w) en la cadena  $\beta$  del TCR en este punto

**Figura 13**

Secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  mutada del clon 49 de TCR A6

gctgggtgcactcagacccccaaaattccagggtcctgaagacaggacagagcagacactgtagtgtgccaggatatgaacat  
gaatacatgtcclggtatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcaltactcagttgggtgtggtalcaclgaccaagga  
gaagtcccaatggctacaatgtcclccagatcaaccacagaggatttcccgtcaggctgctgtcggctgtccclccagacatct  
gtgtactctgtgccagcagccgggactagcgggagggcgaccagagcagtlactcgggcccgggaccaggctcacggtcac  
agaggacctgaaaaacgtgttcccacccagggtcgtgtgttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggcca  
cactgggtgtcclggccacaggcttctacccgaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggagggtcacagtgggg  
tctgcacagaccgagcccccaaggagcagcccggcccaatgactccagatacgtctgagcagccgctgagggtctcgg  
ccaccltctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggtctcggagaatgacgagtggaaccagga  
tagggccaaaccgtcaccagatcgtcagcggcggaggcctggggtagagcagac

**(SEQ ID 158)**



**Figura 14a**

Secuencia de ADN de la cadena  $\beta$  mutada del clon 134 de TCR A6

```
gctggtgctactcagacccccaaaattccaggctcgaagacaggacagagcatgacactgcagtggtgccaggatgaacat  
gaatacatgtcctgglatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagltgggtgctgglatcactgaccaagga  
gaaglccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcaggctgctgctggctgctccctcccagacatct  
gtgtacttctgtgctcagggccggggctgatgagtgcggaaccagagcagctactcgggcccggcaccaggctcaoggtcac  
agaggacctgaaaaacgtgttcccaccggaggtcgctgtgttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggcca  
cactgggtgctcctggccaccggtttaccaccgaccagtgagctgagctgggtggatgggaaggagggtgcacagtggggt  
ctgcacagaccgcagcccccaaggagcagcccgcccaatgactccagatacgctcgagcagccctgagggctcgg  
ccacctctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaaccagga  
tagggccaaaccgctacccagatcgtcagcggcggggctgggtagagcagactaagctgaattc
```

(SEQ ID 159)

**Figura 14b**

Secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta$  mutada del clon 134 de TCR A6 (BIAcore)

```
MNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQG  
EVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGLMSAEPEQYFGPGTRLTVTEDLK  
NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE  
QPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA  
WGRAD*
```

(SEQ ID 160)

**Figura 14c**

Secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta$  mutada del clon 134 de TCR A6 (ELISA)

```
AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVP  
NGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASRPGLMSAQPEQYFGPGTRLTVTEDLKNVF  
PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA  
LNSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR  
AD
```

(SEQ ID 161)

Figura 15

Clon 134 de TCR A6

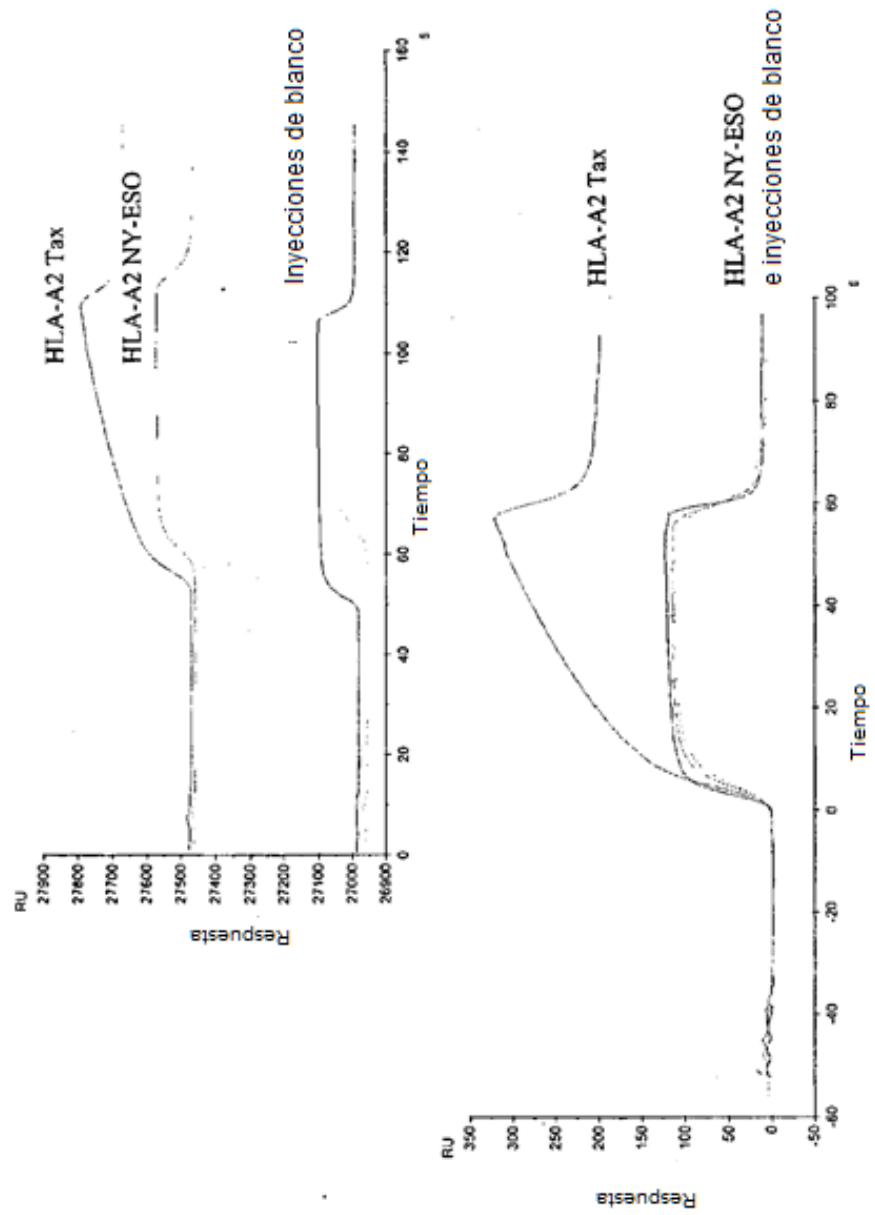
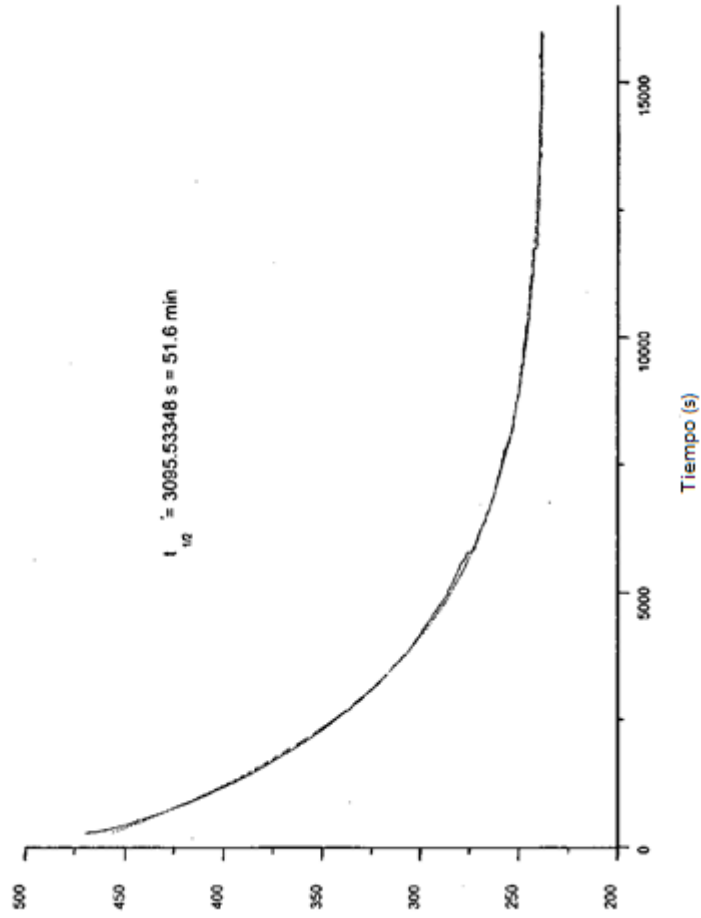


Figura 16



**Figura 17a**

atgcaggaggtagacacagattccctgcagctctgagtgctccagaaggagaaaacttggttcaactgcagtttcaactgata  
 gcgctattacaacctccagtggttaggcaggacctgggaaaggttcacatctctgttcttattcagcaagtcagaga  
 gagcaacaagtggaagacttaatgcctcgtggataaatcatcaggacgtgactttatacattgcagettctcagcctgg  
 tgactcagccacctctctgtctgtgaggcccatcaggaggagctacatacctacatttggagagggaaccagcct  
 tattgttccatccgtatccagaacctgacctgacctgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagctctgtctgct  
 attcaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacaagaagattctgatgtatatacagacaaaatgtgtgtagacatg  
 aggtctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaaca  
 gcattattccagaagacaccttctccccagcccagaaaagtctctaa  
 (SEQ ID 162)

**Figura 17b**

atgggtgctcactcagaccceaaaattccaggctctgaagacaggacagagcatgacactgcagtgctccaggatatgaa  
 ccatgaatacatgtcctgtatcagacaagaccaggcatgggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatcactg  
 accaaggagaagtgcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgtcagcgtgctgtcggctgctc  
 cctccagacatctgttactctgtgccaggttacgtcgggaacaccggggagctgtttttggagaaggctctaggctg  
 accgtactggaggacctgaaaaactgttcccaccgaggctgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacc  
 caaaaggccacactggtgtcctggccacagccttctaccccagccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaagg  
 aggtgcacagtggtgctgcacagaccgcaagggcagcccccgaagggcagcccccgaatgactccagatacgtctgag  
 cagccgctgagggctcggccacctctggcaggaccccgaaccattccgctgtcaagtcagttctacgggctctc  
 ggagaatgacgagtgaccagataggccaaaccgctacccagatcgtcagcggcaggcctggggtagagcag  
 actaa  
 (SEQ ID 163)

**Figura 18a**

MQEV TQIPAALS VPEGENLVLNCSFTDS AIYNLQWFRQ  
 DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYI  
 AASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYI  
 QNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS  
 DVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAF  
 NNSIIPEDTFFPSP ESS Stop  
 (SEQ ID 164)

**Figura 18b**

MGVTQTPKFQVLK TGQSM TLQCAQDMNHEYMSWYRQ  
 DPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFP  
 LRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLE  
 DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPH  
 VELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALS  
 SRLRVSATFWQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRA  
 KPVTQIVSAEAWGRAD Stop (SEQ ID 165)

Figura 19<sup>a</sup>

TTCCTGGCC TTTGCTGGCC TTTGCTCAC ATGTAATGTG AGTTAGCTCA  
AAGGACCGGA AAACGACCGG AAAACGAGTG TACATTACAC TCAATCGAGT  
CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGGC TCGTATGTTG  
GAGTAATCCG TGGGGTCCGA AATGTGAAAT ACGAAGGCCG AGCATACAAC  
TGTGGAATFG TGAGCGGATA ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA  
ACACCTTAAC ACTCGCCTAT TGTAAAGTG TGTCCTTTGT CGTACTGTTG  
TGATTACGCC AAGCTACGTA CTTAAGTATT CTATTTCAAG GAGACAGTCA  
ACTAATGCGG TTCGATGCAT GAATTCATAA GATAAAGTTC CTCTGTCACT  
TAATGAAATA CCTATTGCCT ACGGCAGCCG CTGGATTGTT ATTACTCGCG  
ATTACTTTAT GGATAACGGA TGCCGTCCGG GACCTAACAA TAATGAGCGC  
GCCAGCCGG CCATGGCCAA ACAGGAGGTG ACGCAGATTC CTGCAGCTCT  
CGGGTCCGGC GGTACCCGTT TGTCCTCCAC TGCGTCTAAG GACGTCGAGA  
GAGTGTCCCA GAAGGAGAAA ACTTGGTTCT CAACTGCAGT TTCACTGATA  
CTCACAGGGT CTTCTCTTT TGAACCAAGA GTTGACGTCA AAGTGACTAT  
GGCTATTTA CAACCTCCAG TGGTTTAGGC AGGACCCCTGG GAAAGGTCTC  
CGCGATAAAT GTTGGAGGTC ACCAAATCCG TCCTGGGACC CTTTCCAGAG  
ACATCTCTGT TGCTTATTCA GTCAAGTCAG AGAGAGCAAA CAAGTGGGAG  
TGTAGAGACA ACGAATAAGT CAGTTCAGTC TCTCTCGTTT GTTCACTTC  
ACTTAATGCC TCGCTGGATA AATCATCAGG ACGTAGTACT TTATACATTG  
TGAATTACGG AGCGACCTAT TTAGTAGTCC TGCATCATGA AATATGTAAC  
CAGCTTCTCA GCCTGGTGAC TCAGCCACCT ACCTCTGTGC TGTGAGGCC  
GTCGAAGAGT CGGACCAGTG AGTCGGTGGG TGGAGACAGC ACACCTCCGG  
ACATCAGGAG GAAGCTACAT ACCTACATTT GGAAGAGGAA CCAGCCTTAT  
TGTAGTCTCT CTTGATGTA TGGATGTAAG CCTTCTCTT GGTGCGAATA  
TGTTTATCCG TATATCCAGA ACCCGGATCC TGCCGTGTAC CAGCTGAGAG  
ACAAGTAGGC ATATAGGTCT TGGCCCTAGG ACGGCACATG GTCGACTCTC  
ACTCTAAATC CAGTGACAAG TCTGTCTGCC TATTCACCGA TTTTGATTCT  
TGAGATTTAG GTCACTGTTT AGACAGACGG ATAAGTGGCT AAAACTAAGA  
CAAAACAATG TGTACAAAAG TAAGGATTTT GATGTGTATA TCACAGACAA  
GTTTGTTTAC ACAGTGTTC ATTCTAAGA CTACACATAT AGTGTCTGTT  
ATGTGTGCTA GACATGAGGT CTATGGACTT CAAGAGCAAC AGTGCTGTGG  
TACACACGAT CTGTACTCCA GATACCTGAA GTTCTCGTTG TCACGACACC  
CCTGGAGCAA CAAATCTGAC TTTGCAATGG CAAACGCCCT CAACAACAGC  
GGACCTCGTT GTTTAGACTG AAACGTACAC GTTTGCGGAA GTTGTGTGCG  
ATTATTCCAG AAGACACCTT CTTCCCCAGC CCAGAAAGTT CCTAATAACC  
TAATAAGGTT TTCTGTGGAA GAAGGGGTCG GGTCTTTCAA GGATATTGCG  
TAGGTTAATT AAGAATCTT TAAGAAGGGG ATATACATAT GAAAAAATTA  
ATCCAATTA TTCTTAAGAA ATTCTTCCC TATATGTATA CTTTTTAAAT  
TTATTGCGAA TTCTTTAGT TGTTCCTTT TATTCTACA GCGCGCAGGC  
AATAAGCGTT AAGGAAATCA ACAAGGAAAG ATAAGAGTGT CCGCGCTCCG  
TGGTGTCACT CAGACCCCAA AATFCCAGGT CCTGAAGACA GGACAGAGCA  
ACCACAGTGA GTCTGGGTT TTAAGTCCA GGACTTCTGT CCTGTCTCGT  
TGACACTGCA GTGTGCCAG GATATGAACC ATGAATACAT GTCTGTTGAT  
ACTGTGAGCT CACACGGGTC CTATACTTGG TACTTATGTA CAGGACCATA  
CGACAAGACC CAGGCATGGG SCTGAGGCTG ATTCATTACT CAGTGTGTCG  
GCTGTCTGCG GTCCGTACCC CGACTCCGAC TAAGTAATGA GTCAACCACG  
TGGTATCACT GACCAAGGAG AAGTCCCAA TGGTACAAAT GTCTCCAGAT  
ACCATAGTGA CTGGTTCCCTC TTCAGGGGTT ACCGATGTTA CAGAGSTCTA  
CAACCACAGA GGATTTCCCG CTCAGGCTGC TGTCCGCTGC TCCCTCCAG  
GTTGGTGTCT CCTAAAGGGC GAGTCCGACG ACAGCCGACG AGGGAGGGTC  
ACATCTGTGT ACTTCTGTGC CAGCAGTTAC GTCGGGAACA CCGGGGAGCT  
TGTAGACACA TGAAGACACG GTCGTCAATG CAGCCCTTGT GGCCCTCGA  
GTTTTTTGGA GAAGGCTCTA GGCTGACCCT ACTGAGGAC CTGAAAAACG  
CAAAAAACCT CTTCCGAGAT CCGACTGGCA TGACCTCCTG GACTTTTTGC  
TGTTCCACC CGAGGTCGCT GTGTTGAGC CATCAGAAGC AGAGATCTCC  
ACAAAGGTTG GCTCCAGCGA CACAACTCG GTAGTCTTCG TCTTAGAGG  
CACACCCAAA AGGCCACACT GGTGTGCTG GCCACAGGCT TCTACCCCGA  
GTGTGGGTT TCCCGTGTGA CCACACGGAC CGGTGTCCGA AGATGGGGCT  
CCACGTGGAG CTGAGCTGGT GGGTGAATGG GAAGGAGGTG CACAGTGGGG  
GGTGACCTC GACTCGACCA CCCACTTACC CTTCTCCAC GTGTACCC  
TCTGCACAGA CCCGACGCC CTCAGGAGC AGCCCGCCT CAATGACTCC  
AGACGTCTCT GGGCGTCCGG GAGTTCCTCG TCGGGCCGGA GTTACTGAGG  
AGATACGCTC TGAGCAGCCG CCTGAGGGTC TCGGCCACCT TCTGGCAGGA  
TCTATGCGAG ACTCGTCGGC GGACTCCAG AGCCGGTGGG AGACCGTCT  
CCCCGCAAC CACTTCCGCT GTCAAGTCCA GTTCTACGGG CTCTCGGAGA  
GGGGCGTTG GTGAAGGCCA CAGTTCAGGT CAAGATGCCG GAGACCTCT  
ATGACGAGTG GACCCAGGAT AGGGCCAAC CCGTCAACCA GATCGTCAGC  
TACTGCTCAC CTGGGTCTTA TCCCGTFTG GGCAGTGGT CTAGCAGTGC

GCCGAGGCCT GGGGTAGAGC AGACGGGGCC GCA  
CGGCTCCGGA CCCCATCTCG TCTGCGCCGG CGT  
(SEQ ID 166)

Figura 19b

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

(SEQ ID 167)

Figura 20

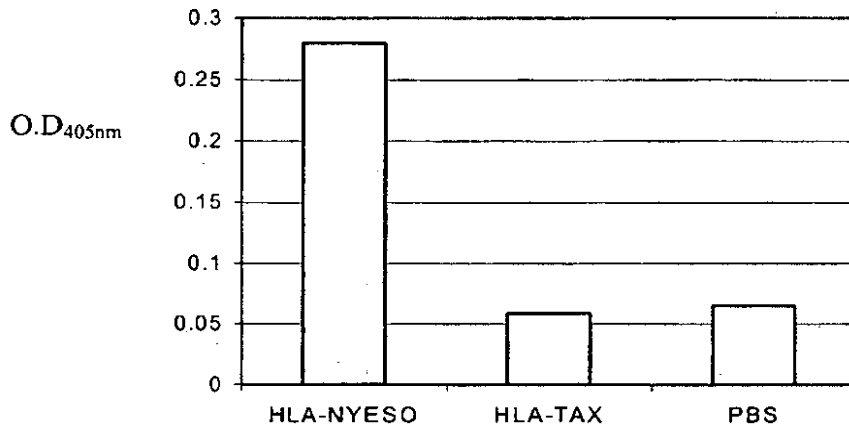


Figura 21

**DRA0101**

```

1 ggatccatgg ccataagtgg agtccctgtg ctaggatttt tcatcatagc tgtgctgatg
61 agcgctcagg aatcatgggc tatcaaagaa gaacatgtga tcatccaggc cgagttctat
121 ctgaatcctg accaatcagg cgagtttatg ttgactttg atggatgatga gattttccat
181 gtggatatgg caaagaagga gacggctctg cggttgaag aatttgacg atttgccagc
241 tttgaggctc aagggtcatt ggccaacata gctgtggaca aagccaacct ggaaatcatg
301 acaaagecgt ccaactatac tccgatcacc aatgtacctc cagaggtaac tgtgctcacg
361 aacagccctg tggaaactgag agagcccaac gtccctatct gttcatcga caagttcacc
421 ccaccagtgg tcaatgtcac gtggcttctga aatggaaaac ctgtcaccac aggagtgtca
481 gagacagtct tcctgcccag ggaagaccac cttttccgca agttccacta tctccccttc
541 ctgccctcaa ctgaggacgt ttacgactgc aggggtggagc actggggctt ggatgagcct
601 cttctcaagc actgggagtt tgatgctcca agccctctcc cagagactac agagaacgtg
661 gatgggggtc tgactgatac actccaagcg gagacagatc aacttgaaga caagaagtct
721 gcgttgacga ccgagattgc caatctactg aaagagaagg aaaaactaga gtccatcctg
781 gcagcttacg gatctgggtg tggctggaac gatatttttg aagctcagaa aatcgaatgg
841 catgagtagg atcc

```

xxx - codones de la cremallera de leucina de Fos  
xxx - codones del marcador de biotinilación



Figura 22

```

1 aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga gataagattg
61 aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcgtt ggcaacaacta tttacaatgc ggccaagtta
121 taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg tttgcgtacg
181 tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaaacaaaac cctagtattg
241 gagcaataat cgatttaacc aacacgtcta aatattatga tgggtgcat tttttgcggg
301 cgggcctggt atacaaaaaa attcaagtac ctggccagac tttgcccctt gaaagcatag
361 ttcaagaatt tattgacacg gtaaaagaat ttacagaaaa gtgtcccggc atgttggtgg
421 gcgtgcactg cacacacggt attaatcgca cgggttacet ggtgtgcaga tatttaatgc
481 acaccctggg tattgcgccc caggaagcca tagatagatt cgaaaaagcc agaggtcaca
541 aaattgaaa gcaaaaattac gttcaagatt tattaattta attaatatta tttgcattct
601 ttaacaaata ctttatccta ttttcaaatt gttgcgcttc tccagcga ccaaaactat
661 gcttcgcttg ctccgtttag cttgtagccg atcagtgccg ttgtccaat cgacggtagg
721 attagccggg atattctcca ccacaatgtt ggcaacgttg atgttacgtt tatgcttttg
781 gttttccacg tacgtctttt ggcgggtaat agccgtaaac gtagtgccgt cgcgcgtcac
841 gcacaacacc ggatgtttgc cgtgtccgc ggggtattga accgcgcgat ccgacaaatc
901 caccactttg gcaactaaat cgttgacctg cgcgtctttt tctgcatta tttcgtcttt
961 cttttgcatg gtttctgga agccgggtga catgcccgtt agatcagtca tgacgcgcgt
1021 gacctgcaaa tctttggcct cgtctgctt gtccctgatg gcaacgatgc gttcaataaa
1081 ctctgtttt ttaacaagtt cctcggtttt ttgcgcacc accgcttgca gcgcggttg
1141 gtgctcggg aatgtcgcaa tcagcttagt caccaactgt ttgctctct cctcccgttg
1201 tttgatcgg ggatcgtact tgccgggtgca gagcacttga ggaattactt cttctaaaag
1261 ccattcttgt aattctatgg cgttaaggcaa ttggacttc ataactcagc gaatcacgcc
1321 ggatttagta atgagcactg tatgcccgtg caaatacagc gggtcgcccc tttcacgac
1381 gctggttagag gttagggccc cattttggat ggtctgctca aataacgatt tgattttat
1441 gtctacatga acacgtatag ctttatcaca aactgtatat ttaaaactgt tagcgacgtc
1501 cttggccacg aaccggacct gttgggtcgc ctctagcagc taccgcaggt tgaacgatc
1561 ttctccaaat tfaaatctc caattttaa cgcagccatt ttgatcacg tgtgtcgtt
1621 ttgcaacaac tattgtttt taacgcaaac taaacttatt gtggttaagca ataattaat
1681 atgggggaac atgcccgcct acaacactcg tcggtatgaa cgcagacggc gccggtctcg
1741 gcgcaagcgg ctaaaaactg ttgcgcgttc aacgcggcaa acatcgcaa agccaatagt
1801 acagttttga tttgcatatt aacggcgatt ttttaatta tcttatntaa taaatagtta
1861 tgacgcttac aactccccgc ccgcttgac tcgctgcaec tcgagcagtt cgttgacgcc
1921 tccctccggt tggccgaaca cgtcgagcgg gtggtcgatg accagcggcg tgcgcacgc
1981 gacgcacaag tatctgtaca ccgaatgatc gtcgggcgaa ggcaagtcgg cctccaagtg
2041 gcaatattgg caaattcgaa aatatataca gttgggttgt ttgcgcatat ctatcgtggc
2101 gttgggcatg tacgtccgaa cgttgatttg catgcaagcc gaaattaaat cattgcgatt
2161 agtgcgatta aaacgttgta catcctcgct ttaatcatg ccgctgatta aatcgcgcaa
2221 tcgagtcagg tgatcaaaat gtggaataat gttttctttg tattcccgag tcaagcgag
2281 cgcgtatttt aacaaaactg ccactctgta agttagtttc atttaatgca actttatcca
2341 ataatatatt atgtatcgca cgtcaagaat taacaatgcy cccgtgtcg catctcaaca
2401 cgactatgat agagatcaaa taaagcgcga attaaatagc ttgcgacgca acgtgcacga
2461 tctgtgcacg cgttccggca cgagctttga ttgtaataag tttttacgaa gcgatgacat
2521 gacccccgta gtgacaacga tcacgcccac aagaactgcc gactacaaaa ttaccggta
2581 tgtcgggtgac gttaaaacta ttaagccatc caatcgaccg ttagtcaat caggaccgct
2641 ggtgcgagaa gccgcgaagt atggcgaatg catcgtataa cgtgtggagt ccgctcatta
2701 gagcgtcatg tttagacaag aaagctacat atttaattga tcccgatgat tttattgata
2761 aattgaccct aactccatac accgtattct acaatggcgg ggttttggtc aaaaattccg
2821 gactgcgatt gtacatgctg ttaacggctc cgcctactat taatgaaat aaaaattcca
2881 attttaaaaa acgcagcaag agaaacattt gtatgaaaga atgctgagaa ggaaaagaaa
2941 atgtcgtcga catgctgaac aacaagatta atatgcctcc gttgataaaa aaaatattga
3001 acgatttgaa agaaaacaat gtaccgcgcg gcggtatgta caggaagagg tttatactaa
3061 actgttacat tgcaaacgtg gtttcggtg ccaagtgtga aaaccgatgt ttaatcaagg
3121 ctctgacgca tttctacaac cacgactcca agtgtgtggg tgaagtcag catcttttaa
3181 tcaaatccca agatgtgtat aaaccaccaa actgcccaaa aatgaaaact gtcgacaagc

```

3241 tctgtccggt tgctggcaac tgcagggtc tcaatcctat ttgtaattat tgaataataa  
 3301 aacaattata aatgctaaat ttgtttttaa ttaacgatac aaaccaaacy caacaagaac  
 3361 atttgtagta ttatctataa ttgaaaacy gtagttataa tcgctgaggt aatattttaa  
 3421 atcattttca aatgattcac agttaatttg cgacaatata attttatttt cacataaact  
 3481 agacgccttg tcgctctctt cttcgtattc cttctctttt tcatttttct cctcataaaa  
 3541 attaacatag ttattatcgt atccatataat gtatctatcg tatagagtaa attttttggt  
 3601 gtcataaata tatatgtcct ttttaatggg gtgtatagta ccgctgcgca tagtttttct  
 3661 gtaatttaca acagtgctat tttctggtag ttcttcggag tgtgttgct taattattaa  
 3721 atttatataa tcaatgaatt tgggatcgtc ggttttgtag aatagtgtgc cggcatagta  
 3781 cgcagcttct tctagttcaa ttacaccatt ttttagcagc accggattaa cataactttc  
 3841 caaatgttg tacgaaccgt taacaaaaaa cagttcacct cccttttcta tactattgtc  
 3901 tgcgagcagt tgtttgttgt taaaaataac agccattgta atgagacgca caaactaata  
 3961 tcacaactg gaaatgtcta tcaatataata gttgctgatg atccagcatg ataagataca  
 4021 ttgatgagtt gggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa  
 4081 tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaciaa gttccgagtt  
 4141 tgtcagaaaag cagaccaaac agcggttgga ataatagcga gaacagagaa atagcggcaa  
 4201 aaataatacc cgtatcactt ttgctgatat ggttgatgta atgtagccaa atcgggaaaa  
 4261 acgggaagta ggctcccattg ataaaaaagt aaaagaaaaa gaataaaccc aacatccaaa  
 4321 agttttgtgt ttttaaatag tacataatgg atttccttac gcgaaatcag ggcagacatg  
 4381 gcttgcggg ttattattat ttttgacacc agaccaactg gtaatggtag cgaccggcgc  
 4441 tcagctggaa agttcatttg tgaattgtaa taaaatgtaa tttacagtat agtattttaa  
 4501 ttaataataca aatgatttga taataattct tatttaacta taatatatg tgtggggtg  
 4561 aattaaaggt cccggcatcc tcaaatgcat aatttcatag tcccccttgt tgaagtgtat  
 4621 gcgtatttct gaatctttgt aaaatagcac acaagactcc aacggtttg gcgttttatt  
 4681 tcttctgctc actctagttt attaggcctc tagagatccg ttttatagg ttttttatt  
 4741 acaaaaactgt tacgaaaaca gtaaaatact tatttatttg cgagatggtt atcattttaa  
 4801 ttatctccat gatccaataa acctagaata aagggcccga cctttaattc aaccaacac  
 4861 aatataattat agttaaataa gaattattat caaatcattt gtataattaat taaaatacta  
 4921 tactgtaaat tacattttat ttacaatcac agatcccggg gatccgggta ttagtacatt  
 4981 tattaagcgc tagattctgt gcgttgttga tttacagaca atgttgtgac gtattttaat  
 5041 aattcattaa atttataatc tttagggtgg tatggttagag cgaaaatcaa atgattttca  
 5101 gcgtctttat atctgaattt aaatattaaa tectcaatag atttgtaaaa taggtttcga  
 5161 ttagtttcaa acaaggggtg ttttccgaa ccgatggctg gactatctaa tggattttcg  
 5221 ctcaacgcca caaaaacttg caaatcttgt agcagcaatc tagctttgtc gatattcgtt  
 5281 tgtgttttgt tttgtaataa aggttcgacg tegtccaata tattatgccc ttttgtattt  
 5341 ctttcatcac tgtcgttagt gtacaattga ctgcacgtaa acacgttaa taaagcttgg  
 5401 acatatttaa categggctt gttagcttta ttaggcccgat tatcgtcgtc gtcccaacc  
 5461 tcgtcgttag aagttgcttc cgaagacgat tttgccatag ccacacgacg cctattaatt  
 5521 gtgtcggcta acacgtccc gatcaaat ttagttgagc tttttggaat tatttctgat  
 5581 tgcgggctgt tttgggctg tttcaatcta actgtgccc attttaattc agacaacacg  
 5641 ttagaaagcg atggtgcagg cgggtgtaac atttcagacg gcaaatctac taatggcggc  
 5701 ggtggtggag ctgatgataa atctaccatc ggtggaggcg caggcggggc tggcggcggg  
 5761 ggcggaggcg gaggtggtgg cgggtgatgca gacggcgggt taggctcaaa tgtctcttta  
 5821 ggcaacacag tcggcacctc aactattgta ctggtttcgg gcgcccgttt tggtttgacc  
 5881 ggtctgagac gagtgcgatt ttttctgctt ctaatagctt ccaacaattg ttgtctgtc  
 5941 tctaaagggt cagcggggtg aggttccgct ggcattggtg gagcggggcg caattcagac  
 6001 atcgatggtg gtggtggtg tggagggcgt ggaatgtag gcacgggaga aggtggtggc  
 6061 ggcggtgccc ccggtataat ttgttctggt ttagtttgtt cgcgcacgat tgtgggcacc  
 6121 ggcgaggcg ccgctggctg caaacggaa ggtcgtctgc ttcgaggcag cgcttgggt  
 6181 ggtggcaatt caatattata attggaatac aaatcgtaaa aatctgctat aagcattgta  
 6241 atttcgtctat cgtttaccgt gccgatattt aacaaccgct caatgtaagc aatgtattg  
 6301 taaagagatt gtctcaagct cggatcgatc ccgacgcggc ataacaagcc ttttctttt  
 6361 tactacagca ttgtagtggc gagacacttc gctgtcgtcg acgtacatgt atgctttgtt  
 6421 gtcaaaaacy tegtggcaa gcttataaat atttaaaaga acatctctgt tcagaccac  
 6481 tgtgtgtcgc taaatgttgt ttttgataat ttgcgcttc gcagtatcga cacgttcaaa

6541 aaattgatgc gcatcaatth tgttgttccct attattgaaat aaataagatt gtacagattc  
6601 atatctacga ttcgtcatgg ccaccacaaa tgcctacgctg caaacgctgg tacaatttta  
6661 cgaaaactgc aaaaacgtca aaactcggta taaaataatc aacgggctgt ttggcaaat  
6721 atctatthta tcgcacaagc ccactagcaa attgtatttg cagaaaaaa tttcggcgca  
6781 caattttaac gctgacgaaa taaaagtcca ccagttaatg agcgaccacc caaatthtat  
6841 aaaaatctat thtaatcacg gttccatcaa caaccaagtg atcgtgatgg actacattga  
6901 ctgtcccgat ttatttgaaa cactacaaat taaaggcgag ctttcgtacc aacttgttag  
6961 caatattatt agacagctgt gtgaagcgct caacgatttg cacaagcaca atthcataca  
7021 caacgacata aaactcgaaa atgtcttata tttcgaagca cttgatcgcg tgtatgtht  
7081 cgattacgga ttgtgcaaac acgaaaactc acttagcggtg cacgacggca cgttgaggta  
7141 tthtagtccg gaaaaaattc gacacacaac tatgcacgtt tcgthtgact ggtacgcggc  
7201 gtgttaacat acaagttgct aaccggcggtc cgacaccat ttgaaaaag cgaagacgaa  
7261 atgttggaat tgaatagcat gaagcgtcgt cagcaataca atgacattgg cgtthtaaaa  
7321 cacgttcgta acgthaacgc tcgtgactth gtgtactgcc taacaagata caacatagat  
7381 tgtagactca caaattacaa acaaatthata aaacatgagt thttgtcgta aaaaagccac  
7441 ttgtthtacg agtagaathc ccagcttggc actggcgtg thttthacaac gtcgtgactg  
7501 ggaaaacctt ggcgttacct aactthaatc ccttgacgca catccccct tcgacagctg  
7561 gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg ccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg  
7621 cgaatggcgc ctgatcggtt atthttctcct tacgcactcg tcggttattt cacaccgat  
7681 atggtgcaat ctcaatcaaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc cccgacacc  
7741 gccaacaccc gctgacggc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca  
7801 agctgtgacc gtctcgggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgctcat caccgaaacg  
7861 cgcggacgaa agggcctcgt gatacgccta thtttatagg thaatgtcat gataataatg  
7921 gthttcttaga cgtcaggtgg cactthtcgg ggaatgtgc gggaaacccc thttgthta  
7981 thttctctaaa tacatthcaa tatgtatccg ctcatgagac aataacctg ataaatgctt  
8041 caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt atthcaacatt tccgtgtcgc cctthattcc  
8101 thttttcgcg catthtgcct thctgtthtt gctcacccag aaacgctggt gaaagtthaaa  
8161 gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggt  
8221 aagatccttg agagthttcg ccccgaaagaa cgtthttcaa tgatgagcac thttaaagt  
8281 ctgctatgtg cgcgggtatt atcccgtatt gacgcggggc aagagcaact cggctgcccg  
8341 atacactatt ctcaaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa ccatcttacg  
8401 gatggcatga cagtaagaga atthtgcagt gctgccataa ccatgagtga thaacactgcg  
8461 gccaaacttac thctgacaac gatcggaggga ccgaaggagc taacctcttt thtgcaaac  
8521 atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca  
8581 aacgacgagc gtgacaccac gatgctctgt gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta  
8641 actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaatthaa tagactggat ggaggcggat  
8701 aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc thtccggctg gctggttht tgctgataaa  
8761 gthggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcatthcag cactggggcc agatggttaag  
8821 cctcccgtga tcgtagtht ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat  
8881 agacagatcg ctgagatagg tgccctcactg atthaaagcatt ggttaactgtc agaccaagt  
8941 tactcatata tactthtagat tgatthaaaa thtcatthtt aatthaaaag gatctaggtg  
9001 aagatcctth ttgataatct catgacaaaa atcccctaac gtgagthttc gthtccactga  
9061 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaaagga thtctctgag atcctthttt thtgcgcgta  
9121 atctgctgct tgcaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggthttgtht gccggatcaa  
9181 gagctaccaa ctctthttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaact  
9241 gthcctctag thtagccgta gthtagccac cactthcaaga actctgtagc accgctaca  
9301 tacctcgtct tgctaatcct gthtaccagt gctgctgcca gtggcgataa gthcgtgctt  
9361 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggctcgg ctgaaacggg  
9421 gthtctgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaaactgag atacctacag  
9481 cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gthtccggt  
9541 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggat  
9601 thttatagtc ctgctgggtt tcgccaacct gthactgagc gthcgtthtt gthtgcctc  
9661 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cthttthtacg gthtctggcc  
9721 thttgctggc thttthgctca catgtcttht cctgctgtat cccctgattc thtggataac  
9781 cgtattaccg cthttgagtg agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc  
9841 gthtcaatga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatagca aaccgctct cccgcgct  
9901 tggccgattc atthaatgag ctggcacgac aggtthtccg actggaagc gggcagtgag  
9961 cgaacgcaa thaatgtgag thtagctcact cthtaggcac cccagcttht acactthtat

10021 thtccggctc gthtgtgtg thggaattg agcggataac aatthcacac aggaaacagc  
10081 thtgaccatg atthacg

(SEQ ID 169)

xxx – sitios de enzima de restricción

Figura 23

```

1 ggtaccggat ccagcatggt gtgtctgaag ctcctggag gctcctgcat gacagcgtg
61 acagtgacac tgatggtgct gagctcccca ctggctttgt cgggagacac cggacctaag
121 tacgtcaagc agaacacact gaaactggct tccggtggcg gatctctagt tccacgcggg
181 agtggaggcg gtggttcgg agacacgcgt ccacgtttct tgtggcagct taagtttgaa
241 tgtcatttct tcaatgggac ggagcgggtg cgggtgctgg aaagatgcat ctataaccaa
301 gaggagtccg tgcgcttca cagcgacgtg ggggagtacc gggcggtgac ggagctggg
361 cggcctgatg ccgagtactg gaacagccag aaggacctcc tggagcagag gcgggcccgcg
421 gtggacacct actgcagaca caactacggg gttggtgaga gcttcacagt gcagcggcga
481 gttgagccta aggtgactgt gtatccttca aagacctcag ccctgcagca ccacaacctc
541 ctggtctgct ctgtgagtgg tttctatcca ggcagcattg aagtcaggtg gttccggaac
601 ggccaggaag agaaggctgg ggtggtgtcc acaggcctga tccagaatgg agattggacc
661 ttccagaccc tggatgctg ggaaacagtt cctcggagtg gagaggttta cacctgcca
721 gtggagcacc caagtgtgac gagccctctc acagtggaat ggagagcacg gtctgaatct
781 gcacagagca aggtcgacgg aggcggtggg ggtagaatcg cccggctgga ggaaaaagtg
841 aaaaccttga aagctcagaa ctcggagctg gcgtccacgg ccaacatgct cagggaaacag
901 gtggcacagc ttaaacagaa agtcatgaac tactaggatc c

```

(SEQ ID 170)

xxx - codones de cremallera de Leucina de Jun  
xxx – péptido cargado en HLA

**Figura 24**

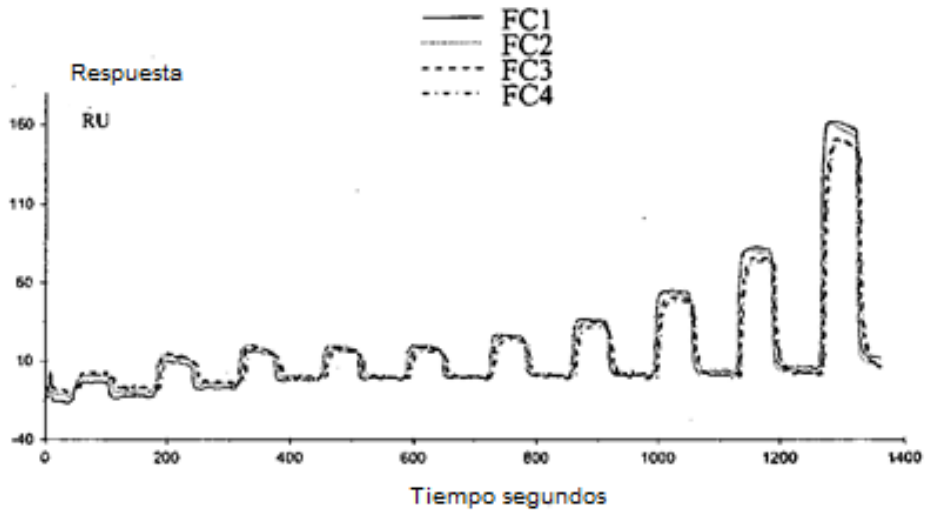


Figura 25

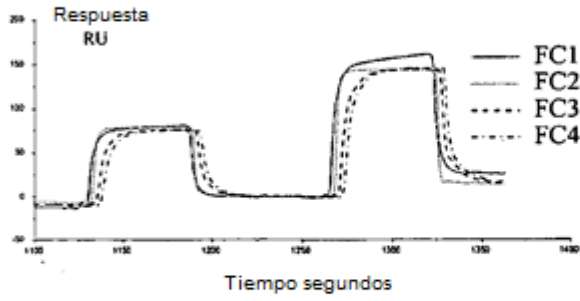
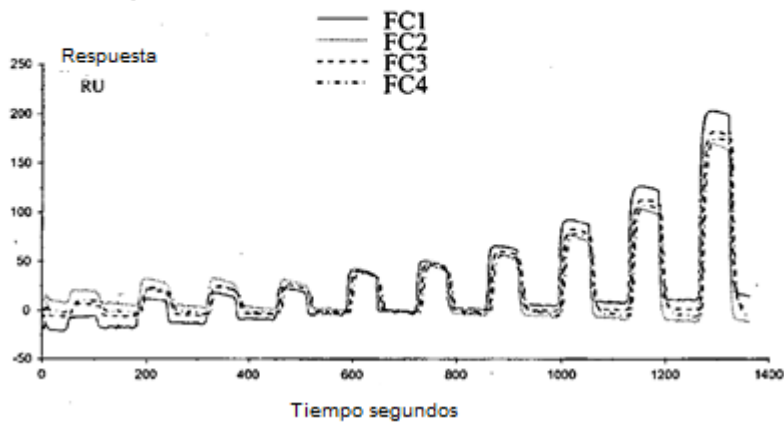
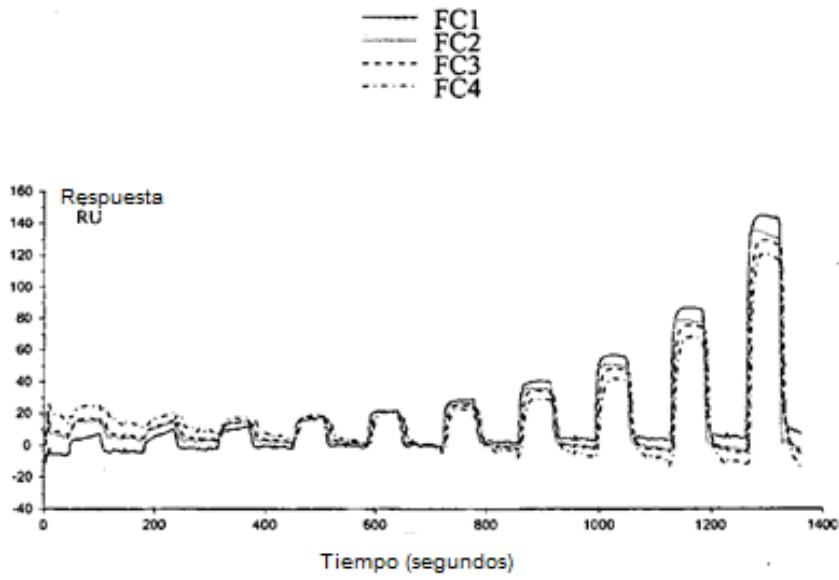


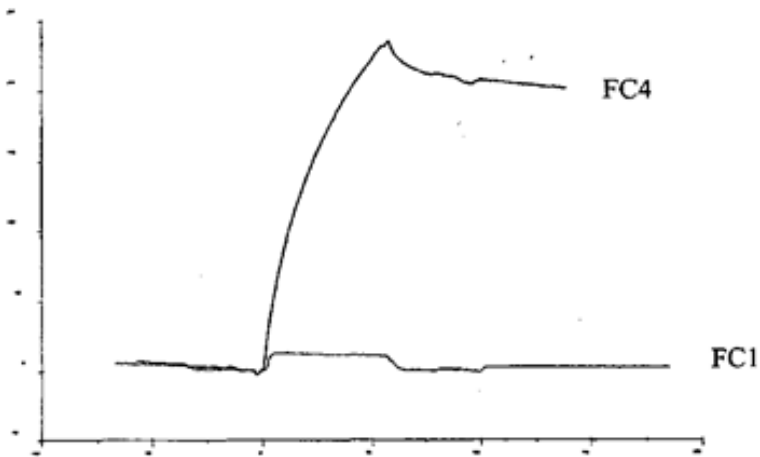
Figura 26



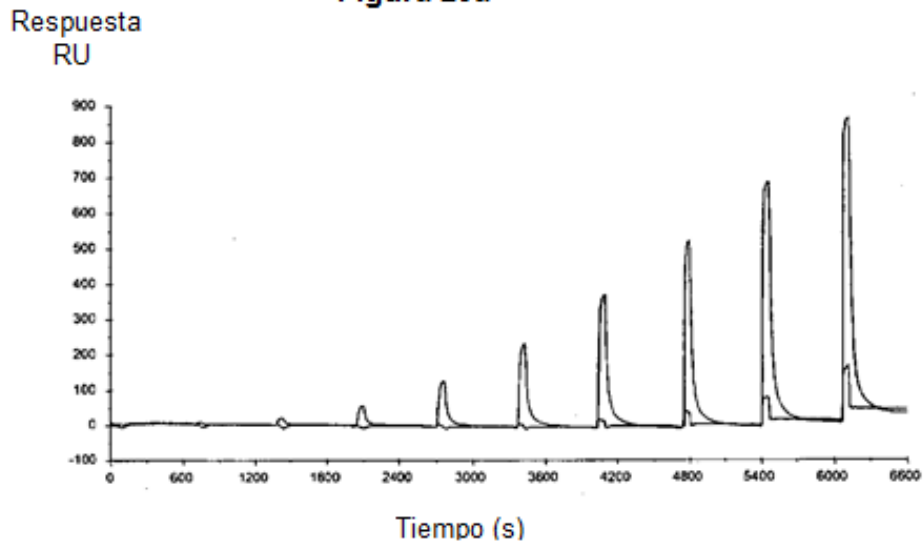
**Figura 27**



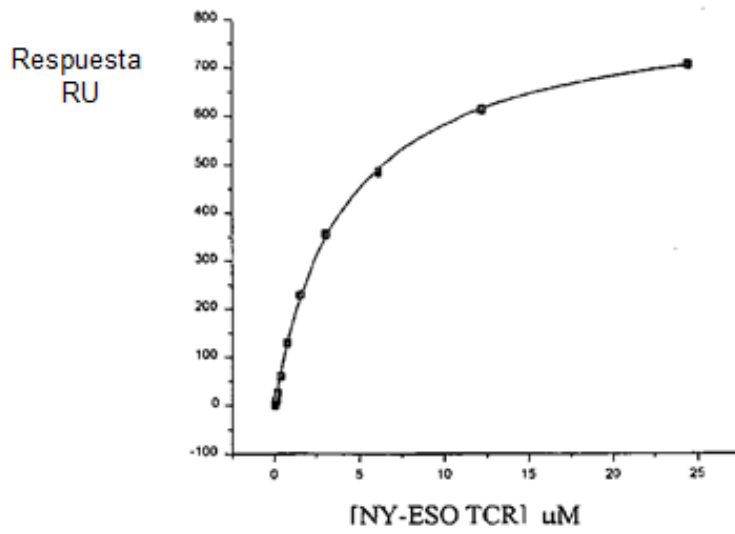
**Figura 28**



**Figura 29a**

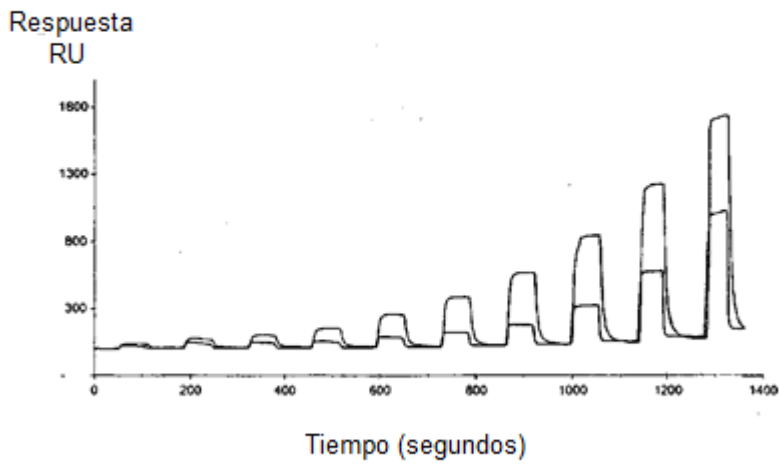


**Figura 29b**

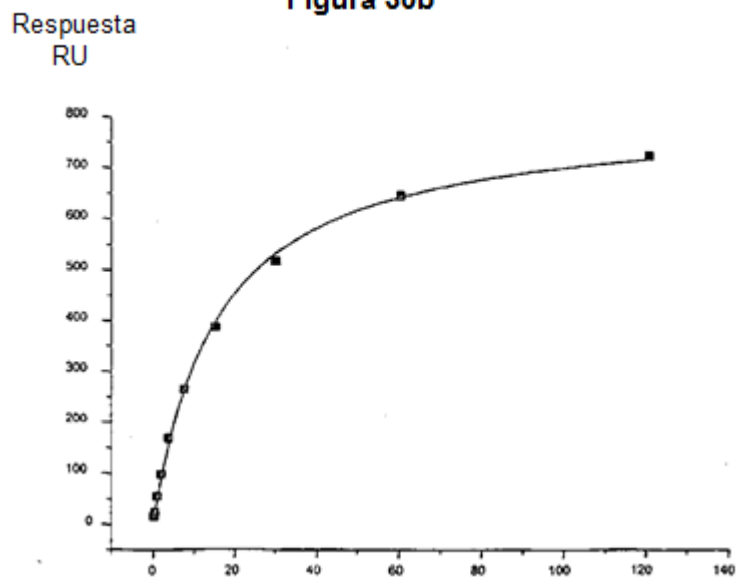




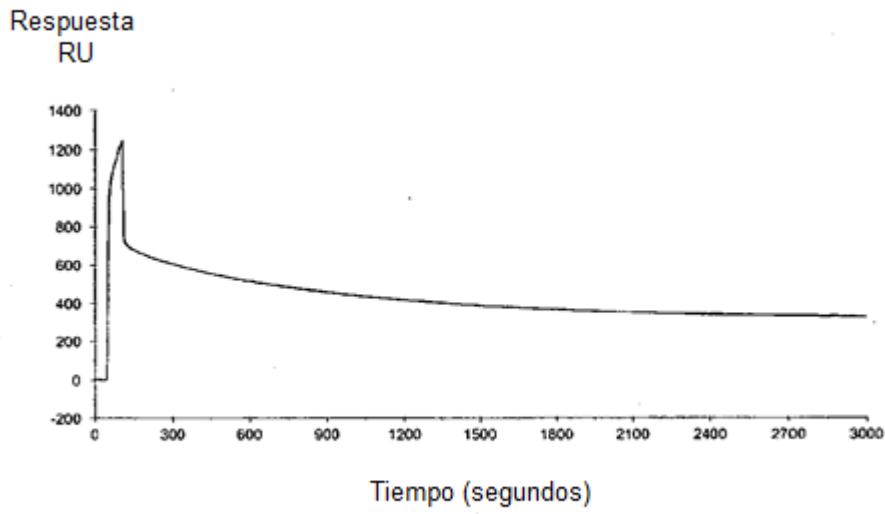
**Figura 30a**



**Figura 30b**



**Figura 31a**



**Figura 31b**

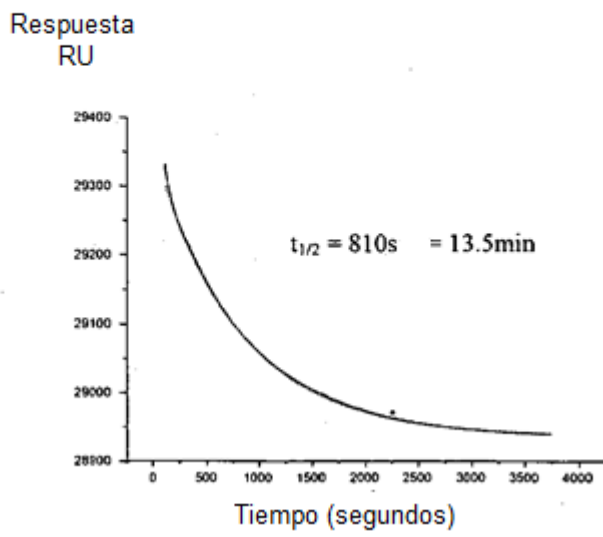


Figura 32a

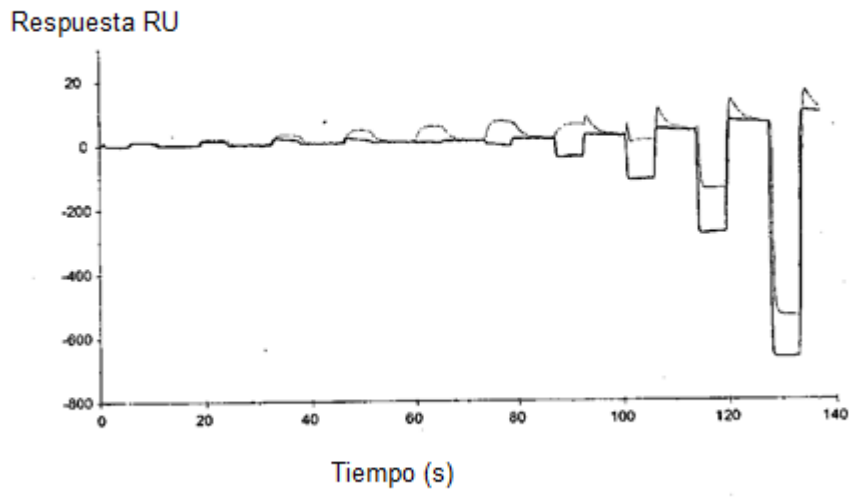
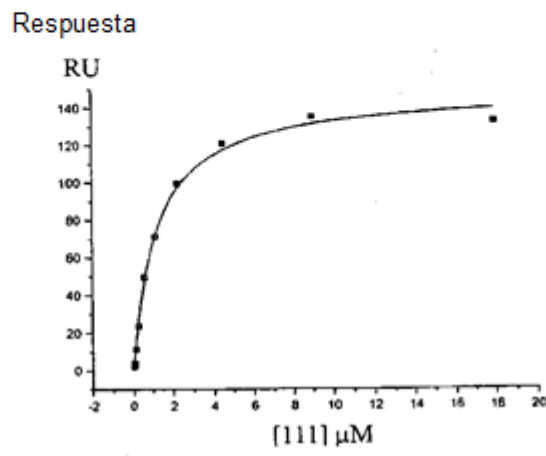
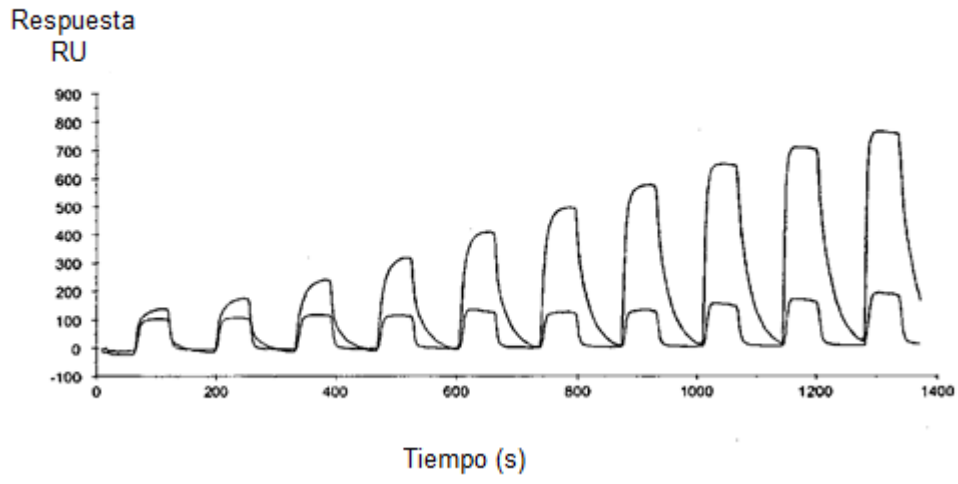


Figura 32b



**Figura 33a**



**Figura 33b**

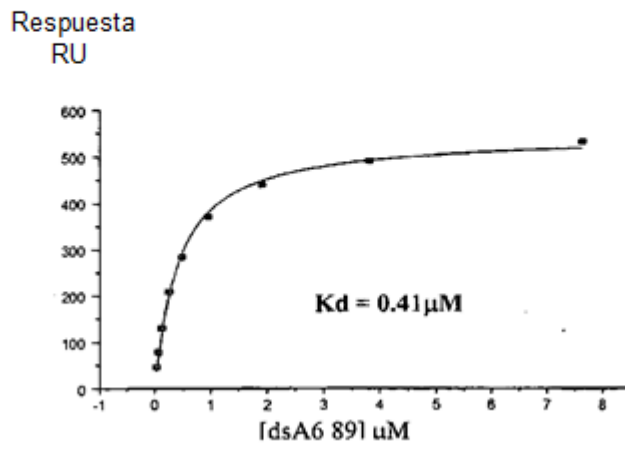


Figura 34

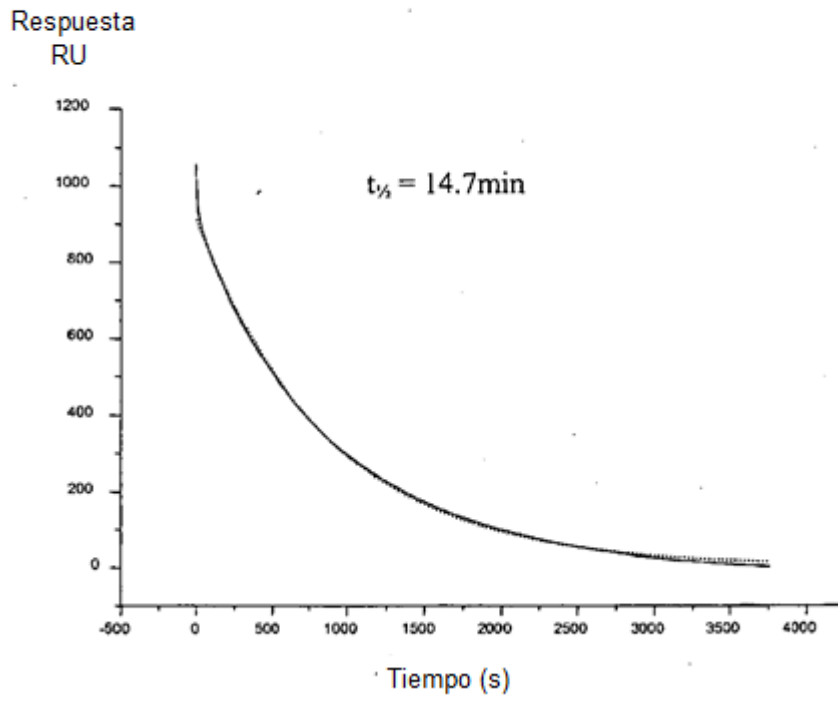


Figura 35

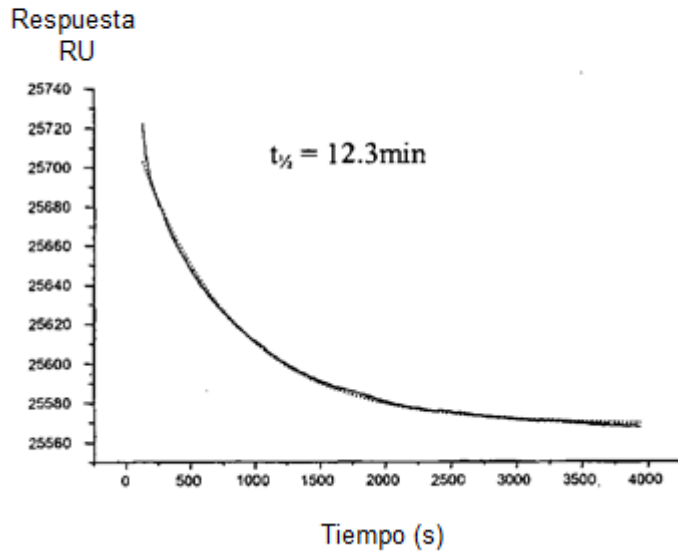


Figura 36

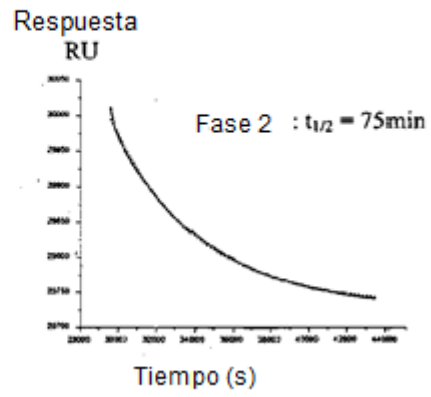
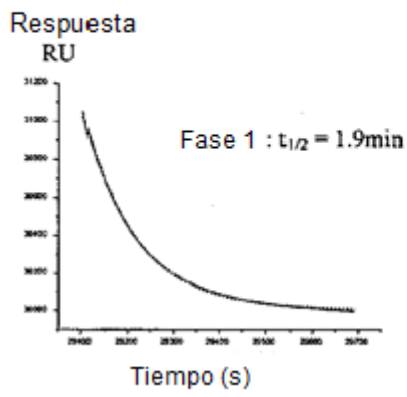
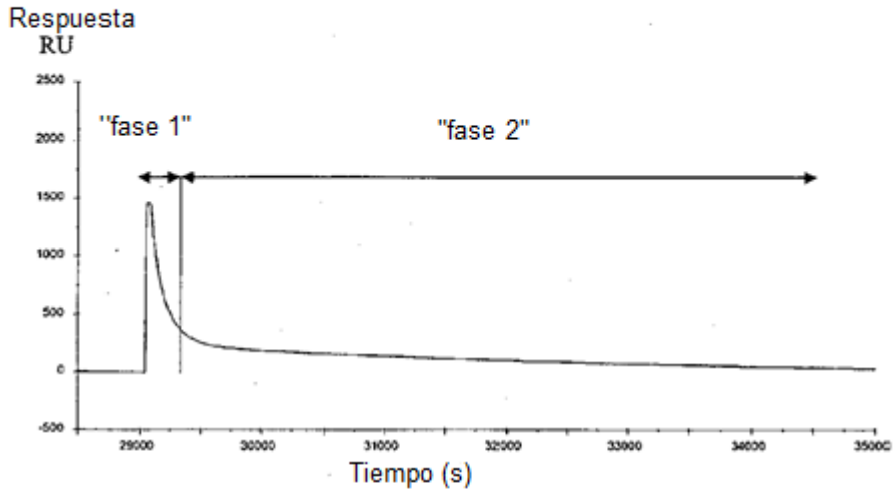


Figura 37a

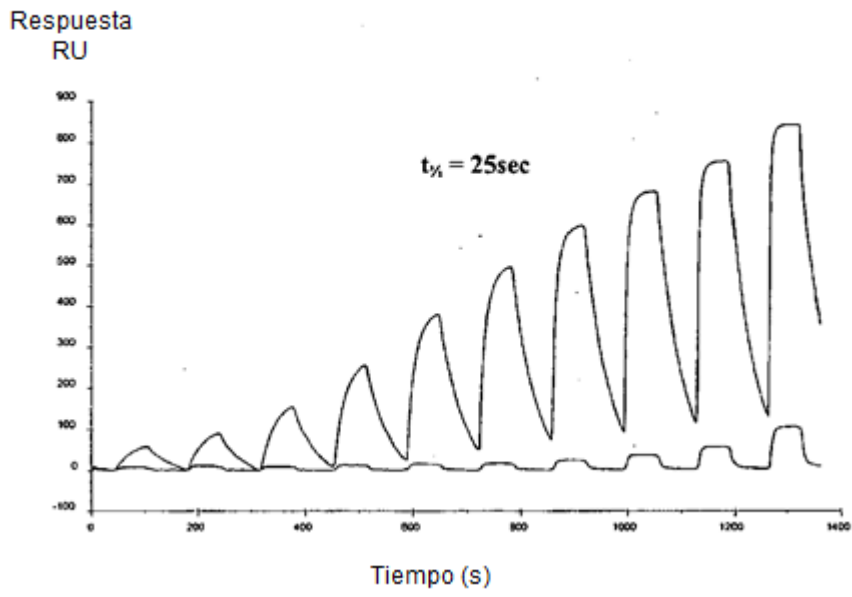
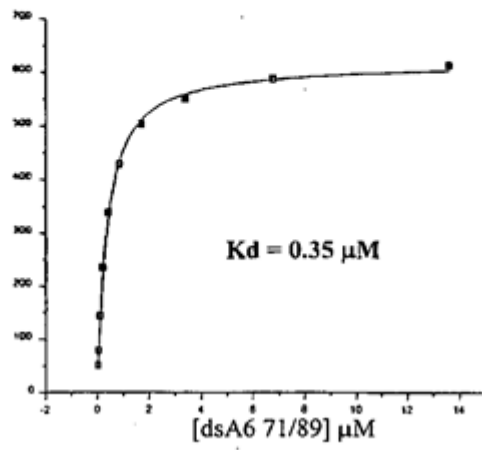


Figura 37b





**Figura 38a**

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG  
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF  
CASRPGLAGG RPEQYFGPGT RLTVT (SEQ ID 171)

**Figura 38b**

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG  
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF  
CASRPGLMSAXPEQYFGPGT RLTVT (SEQ ID 172)

X indica una posición en la cual se pueden insertar aminoácidos E, Q o R

**Figura 38c**

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG  
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF  
CASRPGLAGG RPEQYFGPGT RLTVT (SEQ ID 173)

**Figura 38d**

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG  
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF  
CASRPGLVPG RPEQYFGPGT RLTVT (SEQ ID 174)

**Figura 38e**

MNAGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG  
MGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF  
CASRPGLAGG RPHPQFGPGT RLTVT (SEQ ID 175)

Figura 39a

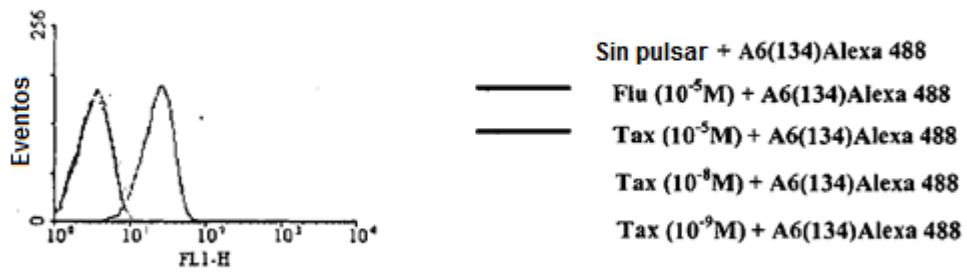
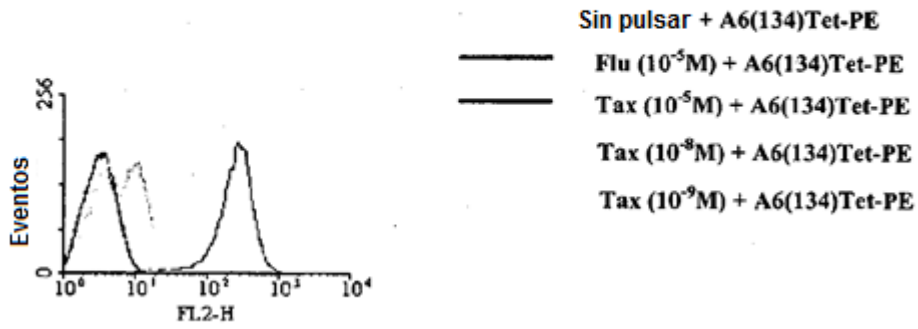


Figura 39b