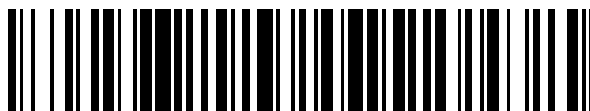


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 190**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2010** **E 10734524 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2448963**

54 Título: **Receptores de linfocitos T**

30 Prioridad:

03.07.2009 GB 0911566

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

24.09.2014

73 Titular/es:

IMMUNOCORE LTD. (100.0%)
91 Milton Park, Abingdon
Oxfordshire OX14 4RY, GB

72 Inventor/es:

JAKOBSEN, BENT KARSTEN;
HARWOOD, NAOMI y
LIDDY, NATHANIEL ROSS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 498 190 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de linfocitos T

- 5 La presente invención se refiere a receptores de linfocitos T (TCR) que se unen al péptido YLEPGPVTA (derivado de la proteína gp100) presentado como un complejo de péptido-HLA-A2, teniendo los TCR mutaciones con respecto a los dominios variables alfa y/o beta de TCR gp100. Algunos de dichos TCR tienen afinidades de unión por, y/o semividas de unión por el complejo al menos doble del de un TCR gp100 de referencia.

10 **Antecedentes de la invención**

El péptido YLEPGPVTA (SEQ ID No: 1) corresponde a los números de restos de aminoácidos 280-288 de la proteína glicoproteína 100 humana (gp100). Gp100 es expresada amplia y significativamente en exceso en células de cáncer melanoma. Por ejemplo, un estudio (Trefzer y col., (2006) *Melanoma Res.* 16(2): 137-45) encontró que
 15 82% de 192 metástasis de melanomas de 28 pacientes con melanoma expresaban gp100. Varios estudios describieron niveles de expresión mayores de gp100 en tejidos de melanoma (Hofbauer y col., (2004) *J. Immunother.* 27(1): 73-8, Barrow y col., (2006) *Clin. Cancer Res.* 12:764-71). El péptido YLEPGPVTA (SEQ ID No: 1) es presentado por moléculas HLA de clase 1 en células de cáncer gyp100⁺ / HLA-A2. (Salgaller y col., (1996) *Cancer Res* 56: 4749-4757).

- 20 Por lo tanto, el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 proporciona un marcador de cáncer al que pueden dirigirse los TCR de la invención. Por ejemplo, los TCR de la invención se pueden usar con el propósito de suministrar agentes citotóxicos a las células de cáncer, o se pueden transformar en linfocitos T, volviéndolos capaces de destruir células tumorales que presentan este complejo de HLA, para la administración a un paciente en el método del tratamiento
 25 conocido como terapia adoptiva. Sin embargo, para el primer propósito sería conveniente que los TCR tuvieran una afinidad considerablemente más alta y/o una velocidad de disociación considerablemente más lenta, de modo que los TCR residan en las células tumorales a las que van dirigidos durante un periodo de tiempo prolongado. Para el último propósito, sería conveniente que los TCR tuvieran una afinidad algo mayor y/o una velocidad de disociación algo más lenta para el complejo de péptido-HLA que los TCR naturales específicos para este complejo, pero no una
 30 afinidad tan alta como para el primer propósito. Un aumento notable en la afinidad se ha asociado con una pérdida de especificidad del antígeno en los linfocitos T CD8 modificados por el gen de TCR, lo cual podría producir la activación no específica de estos linfocitos T CD8 transfectados con TCR, de modo que se preferiría la afinidad intermedia de los TCR para la terapia adoptiva (véase Zhao y col., (2007) *J. Immunol.* 179: 5845-54; Robbins y col., (2008) *J. Immunol.* 180: 6116-31; y véase también el documento publicado WO 2008/038002). La presente invención proporciona dichos TCR.

- Los TCR se describen usando la nomenclatura internacional de inmunogenética (IMGT) de TCR y enlaza con la base de datos pública de IMGT de secuencias de TCR. Los TCR heterodímeros alfa-beta naturales tienen una
 40 cadena alfa y una cadena beta. En general, cada cadena comprende regiones variables, de unión y constantes, y la cadena beta normalmente también contiene una región diversa corta entre las regiones variables y de unión, pero esta región diversa con frecuencia se considera como parte de la región de unión. Cada región variable comprende 3 CDR (regiones determinantes de la complementariedad) insertadas en una secuencia armazón, siendo una la región hipervariable denominada CD3. Hay varios tipos de regiones variables de la cadena alfa (V α) y varios tipos de
 45 regiones variables de la cadena beta (V β) distinguidas por sus secuencias armazón, CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 parcialmente definida. Los tipos de V α se denominan en la nomenclatura IMGT por su número TRAV único. Por lo tanto, "TRAV17" define una región V α de TCR que tiene secuencias armazón y de CDR1 y CDR2 únicas, y una secuencia de CDR3 que está parcialmente definida por una secuencia de aminoácidos que se conserva de un TCR a otro TCR, pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de un TCR a otro TCR. De la misma forma, "TRBV19" define una región V β de TCR que tiene secuencias armazón y de CDR1 y
 50 CDR2 únicas, pero con una secuencia de CDR3 solo parcialmente definida.

Las regiones de unión del TCR están definidas de forma similar por la nomenclatura IMGT TRAJ y TRBJ, y las regiones constantes por la nomenclatura IMGT TRAC y TRBC.

- 55 La región diversa de la cadena beta se denomina en la nomenclatura IMGT por la abreviatura TRBD, y como se ha mencionado, las regiones concatenadas TRBD/TRBJ a menudo se consideran juntas como la región de unión.

- Las cadenas α y β de los TCR $\alpha\beta$ en general se considera que tienen cada una dos "dominios", en concreto dominios variable y constante. El dominio variable consiste en una concatenación de la región variable y la región de
 60 unión. Por lo tanto, en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, la expresión "dominio variable alfa de TCR" se refiere a la concatenación de regiones TRAV y TRAJ, y la expresión dominio constante alfa de TCR se refiere a la región TRAC extracelular o a una secuencia de TRAC truncada C-terminal. Igualmente, la expresión "dominio variable beta de TCR" se refiere a la concentración de regiones TRBV y TRBD/TRBJ, y la expresión dominio constante beta de TCR se refiere a la región TRBC extracelular, o a una secuencia de TRBC truncada C-
 65 terminal.

Las secuencias únicas definidas por la nomenclatura IMGT son ampliamente conocidas y están accesibles para los que trabajan en el campo de los TCR. Por ejemplo, se pueden encontrar en la base de datos pública de IMGT. En "T cell Receptor Factsbook", (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8, también se describen secuencias definidas por la nomenclatura IMGT, pero debido a su fecha de publicación y el consiguiente retardo de tiempo, a veces es necesario confirmar la información en el mismo por referencia a la base de datos de IMGT.

Los autores de la invención han confirmado que un clon de TCR gp100 natural tiene el siguiente uso de genes V, J y C de la cadena alfa y cadena beta:

Cadena alfa - TRAV17/TRAJ29/TRAC (la secuencia extracelular de la cadena alfa de TCR gp100 natural se da en la SEQ ID No: 2.

Cadena beta: - TRBV19*01/TRBD1/TRBJ2-7*01/TRBC2 (la secuencia extracelular de la cadena beta de TCR gp100 natural se da en la SEQ ID No: 3. (Obsérvese que la secuencia de TRBV19 tiene 3 variantes alélicas, designadas en la nomenclatura IMGT TRBV19*01, *02 y *03 respectivamente, y el clon de TCR gp100 natural al que se ha hecho referencia anteriormente tiene la variación *01. De la misma forma, la secuencia de TRBJ2-7 tiene dos variaciones conocidas y es la secuencia *01 la que está presente en el clon de TCR referido anteriormente. Obsérvese también que la ausencia de un calificador "*" significa que solo se conoce un alelo para la secuencia relevante).

Las expresiones "TCR de tipo natural", "TCR natural", "TCR gp100 de tipo natural" y "TCR gp100 natural" se usan de forma sinónima en el presente documento para referirse a este TCR que se encuentra de forma natural que tiene la cadena alfa y beta extracelular de SEQ ID No: 2 y 3.

Los documentos WO 99/60120, WO 03/020763, WO 2004/048410, WO 2006/054096 y EP 1795599 describen receptores de linfocitos T con diferentes especificidades y/o secuencias variables.

Breve descripción de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un receptor celular (TCR) que tiene la propiedad de unirse al complejo YLEPGPVTA (SEQ ID No: 1)-HLA-A2 y que tiene (a) una secuencia del dominio variable de la cadena alfa al menos 90 %, al menos 93 % o al menos 94 % idéntica a los aminoácidos 1 a 109 de la SEQ ID No: 2, en la que los restos de aminoácidos en una o más de las posiciones 94D, 97L, 98V o 102G han mutado, y una secuencia variable de la cadena beta de aminoácidos 1 a 112 de SEQ ID No: 3 excepto que los restos de aminoácidos de una o más de las posiciones 27L, 28N, 29H, 30D, 31A, 50Q, 51I, 52V, 53N, 54D, 61A, 94S, 95I, 96G, 97G, 98P o 100E han mutado; o (b) una secuencia del dominio variable de la cadena beta de una de las SEQ ID NO: 10-35 y una secuencia del dominio variable de la cadena alfa que es al menos 90 %, al menos 93 %, al menos 94 % o 100% idéntica a los aminoácidos 1 a 109 de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, el TCR tiene una afinidad de unión por, y/o una semivida de unión por el complejo de YLEPGPVTA-HLA-A2 al menos doble que un TCR gp100 de referencia, teniendo dicho TCR gp100 de referencia la secuencia de la cadena alfa extracelular de SEQ ID No: 45 y la secuencia de la cadena beta extracelular de SEQ ID No: 46.

Obsérvese que la SEQ ID No: 45 es la secuencia ID No: 2 extracelular de la cadena alfa natural excepto que T157 se ha sustituido por C157 (es decir, T48 de TRAC), y N113 se ha sustituido por K113. Igualmente, la SEQ ID No: 46 es la secuencia ID No: 3 extracelular de la cadena beta natural excepto que S169 se ha sustituido por C169 (es decir, S57 de TRBC2), C187 se ha sustituido por A187 y N201 se ha sustituido por D201. Estas sustituciones de cisteína con respecto a las secuencias extracelulares de la cadena alfa y beta naturales, permiten la formación de un enlace disulfuro entre cadenas que estabiliza el TCR soluble replegado, es decir, el TCR formado por el replegado de las cadenas alfa y beta extracelulares. El uso del TCR soluble unido por disulfuro estable como el TCR de referencia, permite la evaluación más conveniente de la afinidad de unión y semivida de unión. Las otras mutaciones en la cadena alfa de SEQ ID No: 45 y la cadena beta de SEQ ID No: 46 con respecto a las cadenas alfa y beta naturales de SEQ ID No: 2 y 3, son "silenciosas" en el sentido de que no afectan a la afinidad de unión o semivida de unión con respecto a la secuencia natural. Por lo tanto, si un TCR de la invención tiene una afinidad de unión por, y/o una semivida de unión por el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 al menos doble que el TCR gp100 de referencia, implica que también cumple los criterios con respecto al clon de TCR gp100 natural referido anteriormente.

El "TCR gp100 de referencia que tiene la secuencia de la cadena alfa extracelular SEQ ID No: 45 y la secuencia de la cadena beta extracelular SEQ ID No: 46" se denominan de forma sinónima en lo sucesivo como "el TCR de referencia" o "el TCR gp100 de referencia".

La afinidad de unión (inversamente proporcional a la constante de equilibrio K_D) y la semivida de unión (expresada como $T_{1/2}$) se pueden determinar por cualquier método adecuado. Se apreciará que el duplicar la afinidad de un TCR da como resultado la reducción a la mitad de la K_D . La $T_{1/2}$ se calcula como el $\ln 2$ dividido entre la constante de disociación (k_{off}). De modo que duplicar la $T_{1/2}$ da como resultado la reducción a la mitad de la k_{off} . Los valores de K_D

y k_{off} para los TCR normalmente se miden para formas solubles del TCR, es decir, aquellas formas que están truncadas para eliminar restos hidrófobos de dominio transmembrana. Por lo tanto, debe entenderse que un TCR dado cumple los requisitos de que tiene una una afinidad de unión por, y/o una semivida de unión por el complejo de YLEPGPVTA-HLA-A2, si una forma soluble de este TCR cumple este requisito. Preferiblemente, la afinidad de unión o la semivida de unión de un TCR dado se miden varias veces, por ejemplo 3 o más veces, usando el mismo protocolo de ensayo, y se toma una media de los resultados. En una realización preferida, estas mediciones se hacen usando el método de resonancia del plasmón de superficie (BIAcore) del ejemplo 3 del presente documento. El TCR gp100 de referencia tiene una K_D de aproximadamente 19 μM medida por este método, y la k_{off} era aproximadamente $1 s^{-1}$ (es decir, $T_{1/2}$ era aproximadamente 0,7 s).

Como se ha mencionado, YLEPGPVTA es el péptido gp100₂₈₀₋₂₈₈ presentado en el complejo de HLA A2. Sin embargo, es bien conocido que una versión ligeramente modificada de este péptido (YLEPGPVTV (SEQ ID No: 6)) muestra una unión potenciada a HLA-A2, aumentando la estabilidad del complejo péptido-HLA (Salgaller y col. (1996) *Cancer Res.* 56: 4749-57). Por lo tanto la variante del complejo péptido YLEPGPVTV-HLA-A2 es más adecuada para el trabajo de ensayos en la evaluación de los potenciales TCR capaces de unirse al complejo YLEPGPVTA-HLA-A2. Dichos TCR se unen a ambos complejos de péptido-HLA con K_D y $T_{1/2}$ sustancialmente similares.

Algunos TCR de la invención tienen una afinidad y/o semivida de unión por el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 al menos doble que el TCR gp100 de referencia, mientras que retienen una especificidad aceptable del complejo YLEPGPVTA-HLA-A2, por ejemplo, similar al TCR gp100 de referencia. En general, los TCR necesarios como agentes directores para suministrar agentes terapéuticos, tales como agentes efectores citotóxicos o inmunitarios, a células que presentan el complejo de HLA, deben tener afinidades considerablemente mayores y/o semividas de unión más prolongadas para dicho complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 que el TCR gp100 de referencia. Cuando el TCR es necesario para la transfección de linfocitos T para terapia adoptiva, en general se requieren afinidades menores, por ejemplo, y/o semividas de unión más cortas (aunque todavía respectivamente el doble del TCR de referencia).

Por ejemplo, los TCR de la invención pueden tener una K_D para el complejo $\leq 8 \mu M$, $\leq 5 \mu M$, $\leq 1 \mu M$, $\leq 0,1 \mu M$, $\leq 0,01 \mu M$, $\leq 0,001 \mu M$, o $\leq 0,0001 \mu M$ y/o tener una semivida de unión ($T_{1/2}$) para el complejo $\geq 1,5 s$, $\geq 3 s$, $\geq 10 s$, $\geq 20 s$, $\geq 40 s$, $\geq 60 s$, $\geq 600 s$, o $\geq 6000 s$.

Para los propósitos de la presente invención, un TCR es un resto que tiene al menos el dominio variable alfa de TCR y/o beta de TCR. En general, comprenden tanto un dominio variable alfa de TCR como un dominio variable beta de TCR. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta$ o pueden tener formato de cadena sencilla. Para usar como un agente director para el suministro de agentes terapéuticos a la célula presentadora de antígeno, un TCR heterodímero $\alpha\beta$ puede estar en forma soluble (es decir, que no tiene dominios transmembrana o citoplasmáticos). Para la estabilidad, dichos TCR solubles preferiblemente tienen un enlace disulfuro introducido entre los restos de los respectivos dominios constantes, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/020763. Uno o ambos dominios constantes presentes en un heterodímero $\alpha\beta$ de la invención pueden estar truncados en el extremo C o los extremos C, por ejemplo hasta 15 o hasta 10 o hasta 8 o menos aminoácidos. Para usar en terapia adoptiva, un TCR heterodímero $\alpha\beta$ se puede, por ejemplo, transfectar como cadenas de longitud entera que tienen tanto dominios citoplasmáticos como transmembrana. Si se desea, puede estar presente un enlace disulfuro introducido entre los restos de los respectivos dominios constantes (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/000830). Para usar como un agente director para el suministro de agentes terapéuticos a la célula presentadora de antígeno, un TCR soluble puede estar en formato de cadena sencilla. Estos pueden incluir polipéptidos de TCR $\alpha\beta$ de los tipos $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$, o $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β , en los que $V\alpha$ y $V\beta$ son las regiones variables α y β de TCR respectivamente, C α y C β son las regiones constantes α y β de TCR respectivamente, y L es una secuencia conectora. La terapia adoptiva puede usar secuencias de TCR de longitud completa que incorporan los dominios transmembrana como formatos tanto de enlace disulfuro natural como disulfuro introducido, o como una construcción de TCR de cadena sencilla; y/o variaciones en torno a este tema.

Cualquiera que sea el formato, los TCR de la invención tienen mutaciones con respecto al TCR gp100 natural que tiene las secuencias de cadena alfa y beta extracelulares de SEQ ID No: 2 y 3 en su dominio variable alfa (que se extiende de S1 a A109 de la SEQ ID No: 2) y opcionalmente el dominio variable beta (que se extiende de D1 a T112 de la SEQ ID No: 3). El TCR gp100 natural o TCR gp100 de referencia se pueden usar como un molde en el que se pueden introducir las diferentes mutaciones que producen alta afinidad y/o una velocidad de disociación lenta para la interacción entre los TCR de la invención y el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2. Realizaciones de la invención incluyen TCR que tienen mutaciones con respecto al dominio variable de la cadena α que se extiende de S1 a A109 de la SEQ ID No: 2 y/o el dominio variable de la cadena β que se extiende de D1 a T112 de la SEQ ID NO: 3, en al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) y/o la región almacén del dominio variable del mismo.

Las mutaciones se pueden llevar a cabo usando cualquier método adecuado incluyendo, pero sin limitar, los basados procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación basada en enzimas de restricción, o clonación independientes de ligado (LIC). Estos métodos se detallan en muchos textos de biología

molecular estándar. Para más detalles en relación con la mutagénesis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la clonación basada en enzima de restricción, véase Sambrook & Russell, (2001) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (3rd Ed.) CSHL Press. Se puede encontrar más información sobre procedimientos LIC en (Rashtchian, (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 (1): 30-6).

5 Un método para generar el TCR gp100 de alta afinidad de la invención es la selección de una biblioteca diversa de partículas de fago tales como los TCR descritos en el documento WO 2004/044004.

10 Debe observarse que cualquier TCR $\alpha\beta$ que comprende similar uso de genes de $V\alpha$ y $V\beta$ y por lo tanto secuencias de aminoácidos del dominio variable, al del TCR gp100 de referencia puede hacer un TCR molde conveniente. Por lo tanto, sería posible introducir en el ADN que codifica uno o ambos dominios variables del TCR $\alpha\beta$ molde los cambios necesarios para producir los TCR de alta afinidad mutados de la invención. Como será evidente para los expertos en la materia, las mutaciones necesarias se pueden introducir por una serie de métodos, por ejemplo, mutagénesis dirigida.

15 Los TCR preferidos de la invención incluyen aquellos cuyo dominio variable alfa tiene al menos 93 %, y preferiblemente al menos 94 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 1 a 109 de SEQ ID No: 2 (es decir, menos de 7 % o preferiblemente menos de 6 % de los restos del dominio $V\alpha$ natural han cambiado), y/o cuyo dominio variable beta tiene al menos 90 % (por ejemplo, al menos 93 %, y preferiblemente al menos 94 %) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 1 a 112 de SEQ ID No: 3 (es decir, menos de 10 % (o menos de 7 % o preferiblemente menos de 6 %) de los restos del dominio $V\beta$ natural han cambiado). Un solo cambio incluye una sola inserción, eliminación o mutación. La identidad de secuencia se puede determinar, por ejemplo, por alineamiento de secuencias, sea de forma manual o usando programas de ordenador.

25 En algunas realizaciones, los TCR de la invención tienen el dominio variable de la cadena alfa que se extiende de S1 a A109 de la SEQ ID No: 2, excepto que los restos de aminoácidos en una o más de las posiciones 94D, 97L, 98V o 102G tienen mutaciones, y/o tienen el dominio variable de la cadena beta que se extiende de D1 a T112 de la SEQ ID No: 3, excepto que los restos de aminoácidos en una o más de las posiciones 27L, 28N, 29H, 30D, 31A, 50Q, 51I 52V, 53N, 54D, 61A, 94S, 95 I, 96G, 97G, 98P o 100E tienen mutaciones. Por ejemplo, los TCR de la invención pueden tener una o más de las mutaciones de aminoácidos en el dominio variable de la cadena alfa 94S, 94T, 94R, 97M, 98M, 98Q, 98G, 98S, 98A o 102D usando la numeración mostrada en la SEQ ID No: 2, y/o una o más de las mutaciones de aminoácidos en el dominio variable de la cadena beta, 27I, 28F, 29Q, 30K, 31K, 50W, 51A, 51G, 52Q, 52Y, 52T, 53G, 53F, 54N, 54H, 61T, 94L, 95Y, 95H, 95W, 95F, 95S, 95V, 96C, 97E, 97A, 98G, 100Q o 100P, usando la numeración mostrada en la SEQ ID No: 3.

35 Los TCR específicos de la invención incluyen los que comprenden una o más secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de SEQ ID No: 7, 8 y 9 y/o una de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de SEQ ID No: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35. Por lo tanto, los TCR con la secuencia del dominio variable de la cadena alfa natural (de S1 a A109 de la SEQ ID No: 2) se pueden asociar con una cadena beta que tiene una de las SEQ ID No: 10-35. Alternativamente, una cadena alfa que tiene una de las SEQ ID No: 7-9 se puede asociar con la secuencia del dominio variable de la cadena beta natural (de D1 a T112) de la SEQ ID No: 3. Alternativamente, la cadena alfa que tiene una de las SEQ ID No: 7-9 se puede asociar con una cadena beta que tiene una de las SEQ ID No: 10-35. Actualmente los TCR solubles preferidos para usos directores, principalmente por su alta afinidad y lenta velocidad de disociación (es decir, semivida larga), son los que comprenden la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa SEQ ID No: 8 (X = S o A o G) y la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta SEQ ID No: 27. Dichos TCR preferidos están preferiblemente en formato heterodímero $\alpha\beta$, es decir, que incluyen dominios TRAC y TRBC. Como se ha mencionado, dichos dominios TRAC y TRBC pueden estar truncados en un extremo C o ambos extremos C. Por ejemplo, el extremo C del dominio constante de la cadena alfa del TCR de referencia puede estar truncado por eliminación de hasta 15, o hasta 10 o hasta 8 o menos aminoácidos.

55 Las variantes fenotípicamente silenciosas de los TCR descritos anteriormente también forman parte de esta invención. La expresión "variantes fenotípicamente silenciosas" se refieren a TCR que tienen secuencia idéntica a un TCR de la invención, excepto que incorporan cambios en los dominios constante y/o variable que no alteran la afinidad y/o velocidad de disociación para la interacción con el complejo péptido-HLA. Se proporciona un ejemplo de dicha variante con los TCR de la invención en los que el dominio constante alfa del TCR contiene un resto de aminoácido serina 130 (S) sustituido por un resto de aminoácido fenilalanina (F) usando la numeración de la SEQ ID NO: 2.

60 Como se ha mencionado antes, los TCR heterodímeros $\alpha\beta$ de la invención pueden tener un enlace disulfuro introducido entre sus dominios constantes. Los TCR preferidos de este tipo incluyen los que tienen una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 excepto que la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 se sustituyen pro restos cisteína, formando dichas cisteínas un enlace disulfuro entre la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR.

65

Con o sin el enlace entre cadenas introducido mencionado en el párrafo precedente, los TCR heterodímeros $\alpha\beta$ de la invención pueden tener una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR pueden estar unidas por el enlace disulfuro natural entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

Como se ha mencionado, los TCR solubles de la invención se pueden asociar (de forma covalente o de otra forma) con un marcador detectable (con fines de diagnóstico en el que el TCR se usa para detectar la presencia de células que presentan el complejo YLEPGPVTA HLA-A2); un agente terapéutico; un resto modificador de la PK (por ejemplo, por PEGilación); o una combinación de los anteriores.

Los marcadores detectables para los fines de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a marcadores fluorescentes o luminiscentes, radiomarcadores, reactivos de contraste de MRI o CT, o enzimas que producen un producto detectable.

Los agentes terapéuticos que se pueden asociar con los TCR de la invención incluyen, pero no se limitan a compuestos radiactivos, enzimas activadores de profármaco (por ejemplo, DT-diaforasa (DTD) o proteína similar a bifenil-hidrolasa (BPHL)), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino), toxinas (por ejemplo, exotoxina de *Pseudomonas* tal como PE38, calcimicina o toxina diftérica), fragmentos de anticuerpos inmunomoduladores tales como por ejemplo dirigidos contra CD3 o dirigidos contra CD16, o citoquinas inmunomoduladoras (por ejemplo IL-2). Para asegurar que los efectos tóxicos se ejercen en el sitio deseado, la toxina podría estar dentro de un liposoma unido al TCR de modo que el compuesto es liberado lentamente, o mediante acoplamiento de la toxina al TCR por un conector lábil. Esto evitará efectos dañinos durante el transporte en el cuerpo y asegurará que la toxina tiene el efecto máximo después de la unión del TCR a células presentadoras de antígeno relevantes.

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- moléculas pequeñas agentes citotóxicos, es decir, compuestos con la capacidad para matar células de mamífero que tienen un peso molecular menor que 700 Daltons. Dichos compuestos también podrían contener metales tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, debe entenderse que estas moléculas pequeñas agentes citotóxicos también incluyen profármacos, es decir, compuestos que se descomponen o convierten en condiciones fisiológicas para liberar los agentes citotóxicos. Los ejemplos de dichos agentes incluyen cisplatino, derivados de maitansina, rachelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, porfimer sófico fotofrina II, temozolomida, topotecán, glucuronato de trimetrexato, auristatina E, vincristina y doxorubicina;

- citotoxinas peptídicas, es decir proteínas o fragmentos de las mismas con la capacidad de matar células de mamífero. Por ejemplo, ricina, toxina diftérica, exotoxina A bacteriana de *pseudomonas*, DNasa y RNasa;

- radionúclidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se descomponen con la emisión simultánea de una o más partículas α o β , o rayos γ . Por ejemplo, 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 multímeros de los mismos;

- inmuoestimulantes, es decir, moléculas inmunoefectoras que estimulan la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, citoquinas como IL-2 e IFN- γ ,

- superantígenos y mutantes de los mismos;

- fusiones TCR-HLA, en las que el HLA define un antígeno inmunógeno;

- quimioquinas tales como IL-8, factor de plaquetas 4, proteína estimuladora del crecimiento de melanoma, etc.;

- anticuerpos o fragmentos de los mismos, incluyendo anticuerpos dirigidos contra determinantes de linfocitos T o células NK (por ejemplo, anti-CD3 o anti-CD28 o anti-CD16);

- activadores de complemento;

- dominios de proteínas xenogénicas, dominios de proteínas alogénicas, dominios de proteínas víricas/bacterianas, péptidos víricos/bacterianos.

Se proporciona una realización preferida mediante un TCR de la invención asociado con un anticuerpo dirigido contra CD3 (anti-CD3), o un fragmento funcional o variante de dicho anticuerpo dirigido contra CD3. El anticuerpo dirigido contra CD3 se puede unir de forma covalente al extremo C o N de la cadena alfa o beta del TCR. Los fragmentos de anticuerpo y las variantes/análogos que son adecuados para usar en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a adnectinas, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂,

- fragmentos dsFv y scFv, u otras proteínas armazón de anticuerpos tales como Nanobodies™ (estas construcciones, comercializadas por Ablynx (Belgium), comprenden un solo dominio pesado variable de inmunoglobulina sintético derivado de un anticuerpo de camélido (por ejemplo, camello o llama)), anticuerpos monodominio (comercializados por Domantis (Bélgica), que comprenden un solo dominio variable de inmunoglobulina de afinidad maduro o dominio ligero variable de inmunoglobulina), UniBodies (comercializados por Genmab, los UniBodies son anticuerpos IgG4 humanos enteros modificados donde se ha eliminado la región bisagra del anticuerpo), anticuerpos trifuncionales (anticuerpos monoclonales con sitios de unión para dos antígenos diferentes), Affibodies (comercializado por Affibody, los Affibodies se basan en un dominio de proteína de 58 restos de aminoácidos, un dominio de haz de triple hélice, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica), anticalinas (miméticos de anticuerpos sintetizados a partir de lipocalinas humanas, que también pueden tener formato de proteínas directoras doble, llamadas duocalinas) o DARPinas (proteínas diseñadas a partir de repeticiones de ankirinas) (que son otro ejemplo de mimético de anticuerpo basado en repeticiones de proteínas, tales como repeticiones de proteínas ankirina o ricas en leucina, que son moléculas de unión ubicuas).
- 15 Las fusiones de TCR-anti-CD3 más particulares de la invención incluyen una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa del TCR seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es S;
- (ii) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es A;
- (iii) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es G;
- (iv) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es S, y el extremo C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 a S203 incluido, basado en la numeración de la SEQ ID No: 45;
- (v) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es A, y el extremo C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 a S203 incluido, basado en la numeración de la SEQ ID No: 45;
- (vi) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es G, y el extremo C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 a S203 incluido, basado en la numeración de la SEQ ID No: 45;
- y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta del TCR-anti-CD3 seleccionada del grupo que consiste en:
- (vii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente;
- (viii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente;
- (ix) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q respectivamente;
- (x) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente, los aminoácidos en las posiciones 108-131 se sustituyen por RTSGPGDGGKGGPGKGGPGGEGTKGTGPGG (SEQ ID No: 44), y los aminoácidos en las posiciones 254-258 se sustituyen por GGEGGGSEGGGS (SEQ ID No: 47);
- (xi) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;
- (xii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;
- (xiii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xiv) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G.

5 (xv) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

10 (xvi) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

15 (xvii) y una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

20 (xviii) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xix) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

25 Los ejemplos de dichas fusiones TCR-anti-CD3 son un TCR en el que:

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (vii);

30 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (x);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (ix);

35 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (viii);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (vii);

40 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xi);

45 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xii);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiii);

50 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiv);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xv);

55 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xvi);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xvii);

60 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xviii);

65 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es

(xix);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xi);

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xii); y

la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiii).

Puesto que los TCR heterodímeros $\alpha\beta$ de la invención son útiles en terapia adoptiva, la invención también incluye una célula aislada, en especial un linfocito T, que presenta un TCR de la invención. Hay una serie de métodos adecuados para la transfección de linfocitos T con ADN o ARN que codifican los TCR de alta afinidad de la invención. (Véase, por ejemplo, Robbins y col., (2008) *J. Immunol.* 180: 6116-6131). Los linfocitos T que expresan los TCR de alta afinidad de la invención serán adecuados para usar en el tratamiento basado en terapia adoptiva, de cánceres gp100⁺ HLA-A2⁺. Como conocerán los expertos en la materia, hay una serie de métodos adecuados mediante los cuales se puede llevar a cabo la terapia adoptiva. (Véase, por ejemplo, Rosenberg y col., (2008) *Nat. Rev. Cancer* 8 (4): 299-308). La invención también incluye ADN y ARN que codifican un TCR de la invención.

Para algunos propósitos, los TCR de la invención pueden estar en forma de multímeros en un complejo que comprende varios TCR para formar un complejo de TCR multivalente. Hay una serie de proteínas humanas que contienen un dominio de multimerización que se podría usar en la producción de complejos de TCR multivalentes. Por ejemplo, el dominio de tetramerización de p53 que se ha usado para producir tetrámeros de fragmentos de anticuerpo scFv que presentaban mayor persistencia en el suero y significativamente menor velocidad de disociación comparado con el fragmento scFv monomérico. (Willuda y col. (2001) *J. Biol. Chem.* 276 (17) 14385-14392). La hemoglobina también tiene un dominio de tetramerización que podría usarse potencialmente para este tipo de aplicación. Un complejo de TCR multivalente de la invención puede tener capacidad de unión potenciada por el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 comparado con un heterodímero del receptor de linfocitos T no multimérico o natural de la invención. Por lo tanto, los complejos multivalentes de TCR de la invención también están incluidos dentro de la invención. Dichos complejos de TCR multivalentes de acuerdo con la invención, son particularmente útiles para el seguimiento o para dirigirse a células que presentan antígenos particulares in vitro o in vivo, y también son útiles como productos intermedios para la producción de otros complejos de TCR multivalentes que tienen dichos usos.

Los TCR de la invención dirigidos al uso en terapia adoptiva están glicosilados cuando son expresados por linfocitos T transfectados. Como es bien conocido, el patrón de glicosilación de los TCR transfectados se puede modificar mediante mutaciones del gen transfectado.

Para la administración a pacientes, los TCR de la invención y los linfocitos T transfectados con TCR de la invención, se pueden proporcionar en una composición farmacéutica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los TCR terapéuticos o similares, complejos de TCR multivalentes y células de acuerdo con la invención, normalmente se suministrarán como parte de una composición farmacéutica estéril, que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéuticamente aceptable puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método de administración deseado para un paciente). Se puede proporcionar en una forma farmacéutica unitaria, en general se proporcionará en un recipiente sellado y se puede proporcionar como parte de un kit. Dicho kit normalmente (aunque no necesariamente) incluirá instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.

La composición farmacéutica se puede adaptar para la administración por cualquier vía adecuada, preferiblemente una vía parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular o preferiblemente intravenosa). Dichas composiciones se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo, mezclando el principio activo con vehículo(s) o excipiente(s) en condiciones estériles.

Las dosificaciones de las sustancias de la presente invención pueden variar entre límites amplios, dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, la edad y estado del individuo que se va a tratar, etc., y en último término un médico determinará las dosificaciones adecuadas.

Ejemplos

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, en los que se hace referencia a las siguientes figuras.

Las figuras 1A y 2A muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de la cadena alfa de TCR gp100 natural que tiene el uso de genes TRAV17/TRAJ29/TRAC, excepto que N113 se ha sustituido por K113 (es decir, N4 de TRAC), y la cadena beta de TCR gp100 natural que tiene el uso de genes

TRBV19*01/TRBD1/TRBJ2-7*01/TRBC2 (SEQ ID No: 2 y 3 respectivamente).

Las figuras 1B y 2B muestran respectivamente las secuencias de ADN que codifican las cadenas alfa y beta de TCR gp100 de tipo natural, solubles, también denominadas las cadenas alfa y beta de TCR gp100 de referencia. Estas secuencias incluyen restos de cisteína adicionales para formar un enlace disulfuro no natural. Los codones mutados que codifican los restos de cisteína adicionales se indican mediante sombreado. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* están subrayadas.

Las figuras 1C y 2C muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de las cadenas alfa y beta de TCR gp100 de tipo natural soluble, o TCR gp100 de referencia (SEQ ID No: 45 y 46 respectivamente) producidas a partir de las secuencias de ADN de las figuras 1B y 2B respectivamente, pero sin la metionina conductora insertada para la expresión eficaz en bacterias. Las cisteínas introducidas están en negrita y subrayadas.

Las figuras 3A-C muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de las variantes de TCR gp100 de alta afinidad. Los restos mutados están en negrita y subrayados.

Las figuras 4A-Z muestran las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de las variantes de TCR gp100 de alta afinidad. Los restos mutados están en negrita y subrayados.

La figura 5A muestra los datos de citometría de flujo para la tinción in vitro de células T2 pulsadas con el péptido gp100 variante YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 6) por un TCR gp100 de alta afinidad.

La figura 5B muestra las imágenes de microscopía de la tinción de células T2 pulsadas con el péptido gp100 variante YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 6) por un TCR gp100 de alta afinidad.

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpos scFv dirigido contra CD3 (en negrita) fusionado mediante un conector, en concreto GGGGS SEQ ID No: 48 (subrayado) en el extremo N de una cadena beta de TCR gp100. La cadena beta de TCR gp100 contiene la región variable SEQ ID No: 27.

La figura 7 es una curva de respuesta que muestra la redirección de linfocitos T mediante un scFv anti-CD3-TCR gp100 de alta afinidad, para matar la línea celular de melanoma Me1526 en un ensayo de citotoxicidad no radiactivo.

La figura 8A muestra la secuencia de ADN para el gen de TCR específico de gp100 de tipo natural (construcción de cadena alfa WT-2A-cadena beta WT con la secuencia de tescovirus porcino-1 2A en negrita y subrayado) para la transducción de linfocitos T.

La figura 8B muestra la secuencia de aminoácidos del TCR específico de gp100 de tipo natural para la transducción de linfocitos T, producida a partir de la secuencia de ADN de la figura 8A. La secuencia de tescovirus porcino-1 2A está en negrita y subrayado.

Las figuras 9A y 9B muestran la liberación de IFN- γ de linfocitos T transducidos con TCR gp100 en respuesta a una variedad de células diana en un ensayo ELISPOT. Estas figuras muestran la activación específica aumentada de los linfocitos T transducidos con los TCR gp100 de alta afinidad comparado con los linfocitos T transducidos con el TCR gp100 natural.

La figura 10 muestra la liberación de IFN- γ de linfocitos T CD8+ activados por diferentes fusiones TCR gp100-scFv anti-CD3 que tienen mayores afinidades por TCR-pMHC.

La figura 11 muestra la liberación de IFN- γ de linfocitos T CD8+ activados por diferentes fusiones TCR gp100-scFv anti-CD3.

La figura 12 muestra la evolución del volumen tumoral medio en un modelo in vivo, usando ratones inmunodeficientes con un xenoinjerto de melanoma humano, y ensayando la eficacia antitumoral de una fusión TCR de alta afinidad por gp100-scFv anti-CD3.

Ejemplo 1

Clonación de las secuencias de la región variable de las cadenas alfa y beta del TCR gp100 de referencia en plásmidos de expresión basados en pGMT7

Los dominios alfa variable de TCR gp100 de referencia y beta variable de TCR se amplificaron por la PCR a partir de ADNc total aislado de un clon de linfocitos T gp100. En el caso de la cadena alfa, se usan un oligonucleótido A1 específico de la secuencia de la región variable de la cadena alfa (ggaattccatgatgagtaacaaggagaagaagatcc SEQ ID No: 39) que codifica el sitio de restricción *NdeI*, una metionina introducida para el inicio eficaz de la expresión en bacterias, y un oligonucleótido A2 específico de la secuencia de la región constante de la cadena alfa (ttgtcagtcgacttagagctctcagctggtacacg SEQ ID No: 40) que codifica el sitio de restricción *SalI*, para amplificar la

región variable de la cadena alfa. En el caso de la cadena beta, se usan un oligonucleótido B1 específico de la secuencia de la región variable de la cadena beta (tctctcatatggatgggtgaattactcaatcccaa SEQ ID No: 41) que codifica el sitio de restricción *NdeI*, una metionina introducida para el inicio eficaz de la expresión en bacterias, y un oligonucleótido B2 específico de la secuencia de la región constante de la cadena beta (tagaaaccggtggccaggcacaccagtgtggc SEQ ID No: 42) que codifica el sitio de restricción *AgeI*, para amplificar la región variable de la cadena beta.

Las regiones variables alfa y beta se clonaron en plásmidos de expresión basados en pGMT7 que contenían C α o C β , por métodos estándar descritos en (Molecular Cloning a Laboratory Manual, 3ª edición de Sambrook and Russell). Los plásmidos se secuenciaron usando un analizador Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer.

Las secuencias de ADN que codifican la cadena alfa de TCR cortadas con *NdeI* y *Sall* se ligaron en el vector pGMT7 + C α , que se cortó con *NdeI* y *XhoI*. Las secuencias de ADN que codifican la cadena beta de TCR cortadas con *NdeI* y *AgeI* se ligaron en el vector separado pGMT7 + C β , que se cortó también con *NdeI* y *AgeI*.

Ligado

Los plásmidos ligados se transforman en células competentes de la cepa de *Escherichia coli* XL1-blue y se cultivan en placa en placas LB/agar que contienen ampicilina 100 μ g/ml. Después de incubación durante la noche a 37 °C, se recogen colonias individuales y se cultivan en 10 ml de LB que contiene ampicilina 100 μ g/ml durante la noche a 37 °C con agitación. Los plásmidos clonados se purifican usando un kit Miniprep (Qiagen) y el inserto se secuencia usando un secuenciador de ADN automático (Lark Technologies).

Las figuras 1C y 2C muestran respectivamente las secuencias de aminoácidos extracelulares de las cadenas α y β de TCR gp100 de referencia, unido por disulfuro, soluble, pero sin la metionina conductora introducida para la expresión eficaz en bacterias (SEQ ID No: 45 y 46 respectivamente) producidas a partir de las secuencias de ADN de las figuras 1B y 2B respectivamente. Obsérvese que se hicieron sustituciones de cisteínas en las regiones constantes de las cadenas alfa y beta para proporcionar un enlace disulfuro entre cadenas artificial en el replegado para formar el TCR heterodímero. Las cisteínas introducidas se muestran sombreadas. Las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción en las secuencias de ADN en las figuras 1B y 2B están subrayadas.

Ejemplo 2

Expresión, replegado y purificación del TCR gp100 de referencia soluble

Los plásmidos de expresión que contienen la cadena α y la cadena β de TCR respectivamente como se han preparado en el ejemplo 1, se transformaron por separado en la cepa de *E.coli* Rosetta (DE3)pLysS, y se cultivaron colonias individuales resistentes a la ampicilina a 37 °C en medio TYP (ampicilina 100 μ g/ml) hasta DO₆₀₀ de -0,6-0,8 antes de inducir la expresión de proteínas con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron 3 h después de inducción por centrifugación durante 30 min a 4000 rpm en un dispositivo Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se lisaron con 25 ml de Bug Buster (NovaGen) en presencia de MgCl₂ y DNaseI. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 min a 13000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después se llevaron a cabo 3 lavados con detergente para separar los residuos celulares y componentes de membrana. Cada vez el sedimento de cuerpos de inclusión se homogeneizó en un tampón Triton (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, Triton-X100 al 0,5 %, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM) antes de sedimentar por centrifugación durante 15 min a 4.000 rpm. Después se separaron el detergente y sal mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM, NaEDTA 1 mM, pH 8,0. Finalmente, los cuerpos de inclusión se dividieron en partes alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C. El rendimiento de las proteínas de cuerpos de inclusión se cuantificó mediante solubilización con guanidina-HCl 6 M y se tomó una medición de la DO en un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Después, se calculó la concentración de proteínas usando el coeficiente de extinción.

Se descongelaron aproximadamente 30 mg de cuerpos de inclusión solubilizados de cadena β de TCR y 60 mg de cadena α de TCR a partir de las soluciones madre congeladas, y se diluyeron en 15 ml de disolución de guanidina (guanidina-hidrócloruro 6 M, Tris HCl 50 mM a pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 10 mM), para asegurar la desnaturalización completa de la cadena. La disolución de guanidina que contenía las cadenas de TCR completamente reducidas y desnaturalizadas se inyectó entonces en 1 litro del siguiente tampón de replegado: Tris 100 mM a pH 8,1, L-Arginina 400 mM, EDTA 2 mM, Urea 5 M. Se añadió la pareja redox (hidrócloruro de cistamina y dihidrócloruro de cistamina (hasta concentraciones finales de 6,6 mM y 3,7 mM, respectivamente), aproximadamente 5 min antes de la adición de las cadenas de TCR desnaturalizadas. La disolución se dejó durante ~1 h. El TCR replegado se dializó en membrana de celulosa de tubo de diálisis (Sigma-Aldrich; Producto N° D9402) contra 10 litros de H₂O a 5 °C $\pm$ 3 °C durante 18-20 h. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió dos veces a Tris 10 mM a pH 8,1 (10 litros) reciente y la diálisis se continuó a 5 °C $\pm$ 3 °C durante otras ~8 h.

El TCR soluble se separó de los productos de degradación, mal plegados e impurezas cargando el replegado dializado en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de

NaCl 0-500 mM en Tris 10 mM a pH 8,1 con 6 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem) a las fracciones de los picos. Después las fracciones se almacenaron a 4 °C y se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie antes de mezclar y concentrar. Finalmente, el TCR soluble se purificó y se caracterizó usando la columna de filtración en gel GE Healthcare Superdex 75HR preequilibrada en tampón de PBS (Sigma). Los picos que eluían a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa se mezclaron y concentraron antes de la caracterización por análisis de resonancia de plasmón de superficie BIAcore.

Ejemplo 3

Caracterización de la unión

Análisis de BIAcore

Se puede usar un biosensor de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore 3000™) para analizar la unión de un TCR soluble a su ligando péptido-MHC. Esto se facilita produciendo complejos de péptido-HLA biotinilados solubles ("pHLA") que se pueden inmovilizar a una superficie de unión recubierta con estreptavidina (chip sensor). Los chips sensores comprenden 4 celdas de flujo individuales que permiten la medición simultánea de la unión del receptor de linfocitos T a 4 complejos pHLA diferentes. La inyección manual del complejo pHLA permite manipular fácilmente el nivel preciso de moléculas de clase I inmovilizadas.

Las moléculas HLA-A*02 de clase I biotiniladas se replegaron in vitro a partir de los cuerpos de inclusión expresados en bacterias que contienen las proteínas subunidades constituyentes y péptidos sintéticos, seguido de purificación y biotinilación enzimática in vitro (O'Callaghan y col. (1999) *Anal. Biochem.* 266: 9-15). La cadena pesada de HLA-A*02 se expresó con un marcador de biotinilación C-terminal que sustituye los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína en una construcción adecuada. Se obtuvieron niveles de expresión de cuerpos de inclusión de -75 mg/l de cultivo bacteriano. La cadena ligera de HLA o β 2-microglobulina (β 2m) también se expresó como cuerpos de inclusión en *E. coli* a partir de una construcción adecuada, con un nivel de -500 mg/l de cultivo bacteriano.

Las células de *E. coli* se lisaron y los cuerpos de inclusión se procesaron hasta aproximadamente 80 % de pureza. El péptido sintético (gp100 YLEPGPVTA) se disuelve en DMSO hasta una concentración final de 4 mg/ml. Los cuerpos de inclusión de β 2m y la cadena pesada se desnaturalizan por separado en guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM a pH 8,1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM. Se preparó el tampón de replegado que contenía L-arginina 0,4 M, Tris 100 mM a pH 8,1, dihidrocloruro de cistamina 3,7 mM, hidrocloreuro de cistamina 6,6 mM y se enfrió a <5 °C. Preferiblemente, el péptido se añade primero al tampón de replegado, seguido de la adición de β 2m desnaturalizada y después la adición de la cadena pesada desnaturalizada. El péptido gp100 YLEPGPVTA se añade al tampón de replegado con 4 mg/l (concentración final). Después se añade β 2m 30 mg/l seguido de cadena pesada 30 mg/l (concentraciones finales). Se dejó que el replegado se completara a 4°C durante al menos 1 h.

El tampón se intercambió por diálisis en 10 volúmenes de Tris 10 mM a pH 8,1. Fueron necesarios dos cambios de tampón para reducir suficientemente la fuerza iónica de la disolución. La disolución de proteína después se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa 1,5 μ m 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 en Tris 10 mM a pH 8,1 usando un purificador Akta (GE Healthcare). El complejo HLA-A*02-péptido eluyó con aproximadamente NaCl 250 mM, y las fracciones de los picos se recogieron, se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Calbiochem) y las fracciones se enfriaron sobre hielo.

Las moléculas de pHLA marcadas por biotinilación se intercambiaron de tampón a Tris 10 mM a pH 8,1, NaCl 5 mM usando una columna de desalinización rápida GE Healthcare equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente tras la elución, las fracciones que contenían proteína se enfriaron sobre hielo y se añadió cóctel inhibidor de proteasa (Calbiochem). Después se añadieron los reactivos de biotinilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado a pH 8), $MgCl_2$ 7,5 mM, y enzima BirA 5 μ g/ml (purificada de acuerdo con O'Callaghan y col. (1999) *Anal. Biochem.* 266: 9-15). Después, la mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante la noche.

Las moléculas de pHLA-A*02 biotiniladas se purificaron usando cromatografía de filtración en gel. Una columna 10/30 GE Healthcare Superdex 75 HR se preequilibró con PBS filtrado y se cargó 1 ml de la mezcla de reacción biotinilada y la columna se desarrolló con PBS a 0,5 ml/min usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las moléculas pHLA-A*02 biotiniladas eluyeron como un solo pico aproximadamente a los 15 ml. Las fracciones que contenían proteína se mezclaron, se enfriaron sobre hielo, y se añadió cóctel inhibidor de proteasa. La concentración de proteína se determinó usando un ensayo de unión de Coomassie (PerBio) y partes alícuotas de moléculas pHLA-A*02 biotiniladas se almacenaron a -20 °C.

Dichos complejos inmovilizados son capaces de unirse tanto a receptores de linfocitos T como a correceptores CD8 α , los cuales pueden ser ambos inyectados en la fase soluble. Se observa que las propiedades de unión a pHLA de los TCR solubles son cualitativa y cuantitativamente similares si el TCR se usa en fase soluble o

inmovilizada. Esto es un control importante para la actividad parcial de especies solubles y también sugiere que los complejos de pHLA biotinilados son biológicamente tan activos como los complejos no biotinilados.

El biosensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) BIAcore 3000™ mide los cambios en el índice de refracción expresados en unidades de respuesta (RU) cerca de una superficie sensora dentro de una pequeña celda de flujo, un principio que se puede usar para detectar interacciones de receptor y ligando y para analizar su afinidad y parámetros cinéticos. Los experimentos de BIAcore se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C, usando tampón de PBS (Sigma, pH 7,1-7,5) como tampón para el experimento y en la preparación de diluciones de las muestras de proteína. Se inmovilizó estreptavidina en las celdas de flujo mediante métodos de acoplamiento de amina estándar. Los complejos de pHLA se inmovilizaron mediante el marcador biotina. Después el ensayo se llevó a cabo pasando el TCR soluble sobre las superficies de las diferentes celdas de flujo con un caudal constante, midiendo la respuesta SPR al hacer esto.

Constante de equilibrio de unión

Los métodos de análisis de BIAcore anteriores se usaron para determinar las constantes de equilibrio de unión. Se prepararon diluciones seriadas de la forma heterodímera soluble unida por disulfuro del TCR gp100 de referencia, y se inyectaron con un caudal constante de 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ en dos celdas de flujo diferentes; una recubierta con -300 RU de complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 específico (o el complejo del péptido variante YLEPGPVTV-HLA-A2), la segunda recubierta con -300 RU de complejo no específico HLA-A2-péptido natural WT1 (RMFPNAPYL). La respuesta se normalizó para cada concentración usando la medición de la celda testigo. Los datos de respuesta normalizados se representaron gráficamente frente a la concentración de la muestra de TCR y se ajustó a un modelo de ajuste de curva no lineal, con el fin de calcular la constante de equilibrio de unión, K_D . (Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2ª edición) 1979, Clarendon Press, Oxford). La forma soluble unida por disulfuro de TCR gp100 de referencia (ejemplo 2) demostró una K_D de aproximadamente 19 μM . A partir de los mismos datos de BIAcore la $T_{1/2}$ era aproximadamente 0,8 s.

La determinación de la afinidad también se repitió usando un péptido variante (YLEPGPVTV - SEQ ID NO: 6) del péptido YLEPGPVTA gp100 (SEQ ID NO: 1) cargado por el HLA-A*0201. El TCR gp100 de referencia unido por disulfuro soluble tiene una afinidad similar (K_D) por el complejo YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 6)-HLA*0201 (aproximadamente 19 μM) que la obtenida para el complejo YLEPGPVTA gp100 (SEQ ID NO: 1)-HLA*0201.

Parámetros cinéticos

Los métodos de análisis de BIAcore anteriores también se usaron para determinar las constantes de equilibrio de unión y las velocidades de disociación.

Para los TCR de alta afinidad (véase el ejemplo 4 más adelante) la K_D se determinó midiendo experimentalmente la constante de la velocidad de disociación, k_{off} , y la constante de la velocidad de asociación, k_{on} . La constante de equilibrio K_D se calculó como $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

Se inyectó TCR en dos celdas diferentes, una recubierta con -300 RU de complejo YLEPGPVTA HLA-A*02 específico (o complejo YLEPGPVTV HLA-A*02 cuando se especifique), la segunda recubierta con -300 RU de complejo HLA-A2-péptido no específico. El caudal se estableció en 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Típicamente, se inyectaron 250 μL de TCR con una concentración equivalente a ~10 veces la K_D . Después se hizo pasar flujo de tampón hasta que la respuesta volvió al valor inicial o habían transcurrido > 2 h. Los parámetros cinéticos se calcularon usando el software BIAevaluation. La fase de disociación se ajustó a una sola ecuación de desintegración exponencial permitiendo el cálculo de la semivida.

Ejemplo 4

Generación de variantes de alta afinidad del TCR gp100 natural

La presentación en fago es un medio por el cual se pueden generar bibliotecas de variantes de TCR gp100 con el fin de identificar mutantes de alta afinidad. Los métodos de presentación en fago y cribado de TCR descritos en (Li et al, (2005) *Nature Biotech* 23 (3): 349-354) se aplicaron al TCR gp100 de referencia del ejemplo 2. Se dirigieron a las 6 regiones CDR del TCR gp100 (que son las mismas en el TCR de referencia que en el TCR natural) por mutagénesis y cada biblioteca de CDR se cribó y seleccionó por separado.

Se identificaron los TCR con afinidades y/o semividas de unión al menos doble de las del TCR gp100 de referencia (y por lo tanto implícitamente al menos doble que las del TCR natural), que tenían uno o más restos de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa 94S, 94T, 94R, 97M, 98M, 98Q, 98G, 98S, 98A o 102D usando la numeración mostrada en SEQ ID No: 2 y/o uno o más restos de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta 271, 28F, 29Q, 30K, 31K, 50W, 51A, 5 G, 52Q, 52Y, 52T, 53G, 53F, 54N, 54H, 61T, 94L, 95Y, 95H, 95W, 95F, 95S, 95V, 96C, 97E, 97A, 98G, 100Q o 100P usando la numeración mostrada en SEQ ID No: 3.

Se muestran ejemplos específicos de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas alfa (SEQ ID No: 7, 8 y 9) y cadenas beta (SEQ ID No: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35) de los TCR de alta afinidad, en las figuras 3A-C y 4A-Z respectivamente. Estas cadenas alfa tienen mutaciones solo en CDR3 y las cadenas beta tienen mutaciones en uno o más de los CDR1, CDR2 y CDR3.

Los heterodímeros de TCR se replegaron usando el método del ejemplo 2 anterior (incluyendo las cisteínas introducidas en las regiones constantes para proporcionar el enlace disulfuro entre cadenas artificial). De este modo se prepararon los TCR, que consistían en (a) la cadena beta del TCR de referencia, junto con las cadenas alfas con mutaciones para incluir los dominios variables de SEQ ID No: 7, 8 y 9; (b) la cadena alfa del TCR de referencia junto con las cadenas beta de TCR de referencia con mutaciones para incluir los dominios variables de las cadenas beta de SEQ ID Nos: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35; y (c) diferentes combinaciones de cadenas beta y alfa que incluyen dominios variables mutantes.

La interacción entre estos TCR gp100 unidos por disulfuro, solubles, de alta afinidad, y el complejo péptido natural YLEPGPVTA-HLA-A*02 se analizó usando el método de BIAcore descrito antes, y los datos de unión se muestran en la tabla 1. La tabla 1A muestra los datos de unión para estos TCR de alta afinidad ensayados frente al complejo de péptido variante YLEPGPVTV-HLA-A*02.

La interacción entre estos TCR gp100 unidos por disulfuro, solubles, de alta afinidad, y el complejo YLEPGPVTV-HLA-A*02 se analizó usando el método de BIAcore descrito antes, y los datos de unión se muestran en la tabla 2.

Tabla 1

SEQ ID del dominio variable de TCR		$k_{off} (s^{-1})$	$T_{1/2}$	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	K_D
α	β				
2 (1-109)	10	2,47e-3	4,6 min	4,77e5	5,18 nM
2 (1-109)	13	0,0109	63 s	2,88e5	37,8 nM
2 (1-109)	14	4,71e-3	2,4 min	3,2e5	14,7 nM
2 (1-109)	16	3,13e-3	3,6 min	2,84e5	11 nM
2 (1-109)	17	5,82e-3	1,9 min	2,99e5	19,5 nM
2 (1-109)	18	3,84e-3	2,9 min	6,54e4	58,7 nM
2 (1-109)	19	3,41e-3	3,3 min	1,25e5	27,2 nM
2 (1-109)	20	0,0133	52 s	3,44e5	38,7 nM

Tabla 1A: datos de unión para los TCR gp100 de la tabla 1 ensayados frente al complejo de péptido variante de gp100-HLA-A2

SEQ ID del dominio variable de TCR		$k_{off} (s^{-1})$	$T_{1/2}$	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	K_D
α	β				
2 (1-109)	10	2,33e-3	4,9 min	4e5	5,83 nM
2 (1-109)	13	0,0102	67 s	3,05e5	33,4 nM
2 (1-109)	14	4,47e-3	2,57 min	3,71e5	12 nM
2 (1-109)	16	3,02e-3	3,8 min	3,16e5	9,5 nM
2 (1-109)	17	5,81e-3	1,98 min	2,32e5	25 nM
2 (1-109)	18	3,56e-3	3,2 min	8,96e4	39,7 nM
2 (1-109)	19	3,33e-3	3,4 min	3,53e5	9,44 nM
2 (1-109)	20	0,0124	56 s	2,78e5	44,6 nM

Las tablas 1 y 1A anteriores muestran que se obtuvieron parámetros cinéticos muy similares, dentro del error experimental, para cada TCR de alta afinidad ensayado frente al complejo péptido gp100 natural YLEPGPVTA-HLA-A*02 o el complejo de péptido gp100 variante YLEPGPVTV-HLA-A*02. Después de esta observación, también se ensayaron algunos TCR de alta afinidad frente al complejo de péptido variante YLEPGPVTV-HLA-A*02 (véase la tabla 2). Se espera que estos TCR presenten parámetros cinéticos muy similares para el complejo de péptido natural-HLA-A*02.

Tabla 2

SEQ ID del dominio variable de TCR		$k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$	$T_{1/2}$	$k_{\text{on}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	K_D
α	β				
2 (1-109)	22	7,05e-4	16,3 min	1,72e5	4,1 nM
2 (1-109)	23	5,6e-4	20,5 min	3,28e5	1,7 nM
2 (1-109)	24	9,93e-5	115 min	4,87e5	0,2 nM
7	20	2,85e-3	4 min	4,55e5	6,2 nM
8	20	2,49e-3	4,6 min	4,36e5	5,7 nM
9	20	2,82e-3	4 min	5,33e5	5,3 nM
8	25	2,35e-5	8 h	6,21 e5	37 pM
8	26	3,75e-5	5 h	4,47e5	83 pM
8	27	6,7e-6	28 h	5,31e5	12 pM
7	3 (1-112)	0,99	0,7 s	1,25e5	7,9 μM
8	3 (1-112)	0,79	0,88 s	1,97e5	4 μM
9	3 (1-112)	0,96	0,72 s	2,08e5	4,6 μM
2 (1-109)	26	5,6e-5	2,7 h	1,7e5	320 μM
2 (1-109)	28	0,082	8,5 s	7,4e4	1,1 μM
2 (1-109)	29	0,122	5,7 s	6,5e4	1,9 μM
2 (1-109)	30	0,194	3,6 s	7,5e4	2,6 μM
2 (1-109)	31	0,54	1,3 s	6,4e4	8,4 μM
2 (1-109)	32	0,385	1,8 s	2,9e4	13,4 μM
2 (1-109)	33	5,75e-2	12,1 s	2,56e5	0,225 μM
2 (1-109)	34	6,3e-3	110,5 s	2,38e5	26 nM
2 (1-109)	35	0,01	69,3 s	1,96e5	51 nM

Nota: En la tabla anterior los TCR con el dominio variable de SEQ ID No: 8 tenían el aminoácido variable X como S. Sin embargo, las variantes con el aminoácido variable X como A tenían $T_{1/2}$ y K_D esencialmente similares.

Ejemplo 5

Tinción de células in vitro usando TCR gp100 de alta afinidad

El siguiente ensayo se llevó a cabo para demostrar que el TCR gp100 de alta afinidad soluble del ejemplo 4 que tiene la $V\alpha$ de SEQ ID No: 8 ($X = S$) y la $V\beta$ de SEQ ID No: 27 era capaz de teñir células T2 pulsadas con el péptido variante YLEPGPVT (SEQ ID NO: 6).

Para los fines de este ejemplo, se fusionó un marcador biotina al extremo C-terminal del dominio constante de la cadena beta de gp100 que tiene la $V\beta$ de SEQ ID No: 27 y se insertó en gen entero ($V\beta + C\beta +$ marcador biotina) en un plásmido de expresión basado en pGMT7. La cadena beta de TCR-marcador biotina se expresó usando el método descrito en el ejemplo 2. El $\alpha\beta$ TCR-marcador biotina se replegó usando el método descrito en el ejemplo 2. El TCR replegado se purificó en una primera etapa de intercambio aniónico usando el método descrito en el ejemplo 2. Después el TCR se biotiniló usando el método descrito en el ejemplo 3. Finalmente, el TCR biotinilado se purificó usando una columna de filtración en gel GE Healthcare Superdex 75HR como se ha descrito en el ejemplo 2.

Reactivos

Medio de ensayo R10: FCS al 10 % (inactivado con calor, Gibco, nº de cat. 10108-165), RPMI 1640 al 88 % (Gibco, nº de cat. 42401-018), glutamina al 1 % (Gibco, nº de cat. 25030-024) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco, nº de cat. 15070-063).

Tampón de FACS: PBS/BSA al 0,5 % (Promega, nº de cat. W3841), EDTA 2 mM

Tampón de microscopía: PBS/BSA al 0,5 % (Promega, nº de cat. W3841), CaPO_4 400 μM , MgPO_4 400 μM .

5 *Método de citometría de flujo*

Células linfoblastoides T2 se pulsaron con un péptido gp100 variante (YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 6)) o un péptido irrelevante (ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 43)) en un intervalo de concentraciones (de 10^{-7} a 10^{-9} M) durante al menos 90 min a 37 °C/5 % de CO_2 en medio R10.

10 Después de los pulsos, las células se lavaron 3 veces en tampón de FACS y se incubaron 1×10^6 células con TCR gp100 biotinilado de alta afinidad (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con tampón de FACS, y se incubaron con estreptavidina-PE (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$: BD biosciences, nº de cat. 349023) durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavado con tampón de FACS, se cuantificó el TCR gp100 de alta afinidad unido por citometría de flujo usando un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500. Se incluyeron testigos usando células 15 T2 pulsadas con péptido en los que se omitió el TCR gp100, o se añadió un TCR irrelevante.

Resultados

20 Se demostró con éxito la tinción de las células T2 pulsadas con entre 10^{-9} M y 10^{-7} M del péptido gp100 variante YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 6) por el TCR gp100 de alta afinidad soluble. Véase la figura 5A para los histogramas de citometría de flujo que demuestran la tinción del ensayo frente al testigo de células T2 pulsadas con péptido. (Las curvas negras son los testigos "sin TCR").

25 *Método de microscopía*

La tinción de las células T2 pulsadas con el péptido variante YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 6) se visualizó por microscopía de fluorescencia usando el TCR gp100 biotinilado de alta afinidad. Los pulsos y la tinción de las células T2 se llevaron a cabo como se ha descrito antes en "citometría de flujo". Después de tinción y lavado, 3×10^4 células se 30 lavaron una vez más en R10 (sin rojo fenol) y finalmente se volvieron a suspender en 400 μl de R10 (sin rojo fenol) y se transfirieron a portaobjetos de vidrio con cámara (Nunc, Lab-tek, nº de cat. 155411) y se dejaron reposar antes de la microscopía de fluorescencia tridimensional.

La microscopía de fluorescencia se llevó a cabo usando un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) con un objetivo 63x 35 Oil (Zeiss). Se usó una fuente de luz Lambda LS que contenía una lámpara de arco de xenón de 300W (Sutter) para la iluminación, y la intensidad de la luz se redujo a niveles óptimos poniendo un filtro de densidad neutra 0,3 y 0,6 en el camino de la luz. Los espectros de excitación y de emisión se separaron usando un conjunto de filtros TRITC/Dil (Chroma). Se generaron las imágenes de las células en tres dimensiones mediante adquisición con apilamiento en z (21 planos, separados 1 μm). La adquisición de imágenes y el análisis se llevaron a cabo usando el software 40 Metamorph (Universal Imaging) como se describe en (Irvine et al., (2002) *Nature* 419 (6909): 845-9, y Purbhoo et al., *Nature Immunology* 5 (5): 524-30).

Resultados

45 La figura 5B muestra la unión satisfactoria de TCR gp100 biotinilado de alta afinidad a células T2 pulsadas con el péptido YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 6).

Ejemplo 6

50 Expresión, replegado y purificación de la fusión scFv anti-CD3-TCR gp100

La SEQ ID No: 36 (figura 6) es la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo scFv dirigido contra CD3 (negrita) fusionado por un conector, en concreto GGGGS SEQ ID No: 48 (subrayado) al extremo N de una 55 cadena β de TCR, pero sin la metionina conductora introducida para el inicio eficaz de la síntesis de proteínas. La cadena β de TCR gp100 contiene el dominio variable SEQ ID No: 27.

La cadena α de TCR gp100 de la fusión de TCR en este ejemplo, contiene el dominio variable SEQ ID No: 8 (figura 3B) con X = S.

60 La construcción anterior se preparó como sigue:

Ligado

Los genes sintéticos que codifican (a) la cadena $V\alpha$ de TCR y (b) la secuencia de fusión SEQ ID No: 36 en la que los 65 aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente, se ligaron por separado en el vector pGMT7 + C α .

(que tiene una cisteína introducida que permite la formación de un enlace disulfuro) y el plásmido de expresión basado en pGMT7, respectivamente, que contienen el promotor T7 para el nivel alto de expresión en la cepa de *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Pan et al., *Biotechniques* (2000) 29 (6): 1234-8). Obsérvese que la metionina conductora se introdujo en el extremo N del dominio variable de la cadena alfa de TCR y en el extremo N de la secuencia de fusión SEQ ID No: 36, para permitir el inicio eficaz de la síntesis de proteínas en bacterias.

Expresión

Los plásmidos de expresión se transformaron por separado en la cepa de *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, y se cultivaron colonias individuales resistentes a la ampicilina a 37 °C en medio TYP (ampicilina 100 µg/ml) hasta DO_{600} de -0,6-0,8 antes de inducir la expresión de proteínas con IPTG 0,5 mM. Las células se recogieron 3 h después de inducción por centrifugación durante 30 min a 4000 rpm en un dispositivo Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se lisaron con 25 ml de Bug Buster (NovaGen) en presencia de $MgCl_2$ y DNasa. Los sedimentos de cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación durante 30 min a 4.000 rpm. Después se llevaron a cabo 3 lavados con detergente para separar los residuos celulares y componentes de membrana. Cada vez el sedimento de cuerpos de inclusión se homogeneizó en un tampón Triton (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, Triton-X100 al 0,5 %, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM) antes de sedimentar por centrifugación durante 15 min a 13.000 rpm en un dispositivo Beckman J2-21. Después se separaron el detergente y las sales mediante un lavado similar en el siguiente tampón: Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaEDTA 1 mM. Finalmente, los cuerpos de inclusión se dividieron en partes alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C.

Replegado

Se descongelaron aproximadamente 20 mg de cuerpos de inclusión solubilizados de cadena α de TCR y 40 mg de scFv-cadena β de TCR, a partir de las soluciones madre congeladas, se diluyeron en 20 ml de una disolución de guanidina (guanidina-hidrócloruro 6 M, Tris HCl 50 mM a pH 8,1, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 20 mM), y se incubaron en un baño de agua a 37 °C durante 30 min-1 h, para asegurar la desnaturalización completa de la cadena. La disolución de guanidina que contenía las cadenas de TCR completamente reducidas y desnaturalizadas se inyectó entonces en 1 litro del siguiente tampón de replegado: Tris 100 mM a pH 8,1, L-Arginina 400 mM, EDTA 2 mM, Urea 5 M. Se añadió la pareja redox (hidrócloruro de cistamina y dihidrócloruro de cistamina (hasta concentraciones finales de 10 mM y 1 mM, respectivamente), aproximadamente 5 min antes de la adición de las cadenas de α de TCR y β de scFv-TCR desnaturalizadas. La disolución se dejó durante ~30 min. El scFv-TCR replegado se dializó en membrana de celulosa de tubo de diálisis (Sigma-Aldrich; Producto N° D9402) contra 10 litros de H_2O durante 18-20 h. Después de este tiempo, el tampón de diálisis se cambió dos veces por Tris HCl 10 mM a pH 8,1 (10 litros) reciente y se continuó la diálisis a 5 °C $\pm$ 3 °C durante otras -8 h. El scFv-TCR soluble y correctamente plegado se separó de los productos de degradación y las impurezas por un método de purificación de 3 etapas como se describe más adelante.

Primera etapa de purificación

El replegado dializado (Tris 10 mM a pH 8,1) se cargó en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y la proteína unida eluyó con un gradiente de NaCl 0-500 mM en 6 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las fracciones de los picos (que eluían a una conductividad de -20 mS/cm) se almacenaron a 4 °C. Las fracciones de los picos se analizaron por SDS-PAGE teñido con colorante Instant Blue (Novexin) antes de mezclarlas.

Segunda etapa de purificación

Purificación por intercambio catiónico

Las fracciones mezcladas del intercambio aniónico se intercambiaron de tampón por dilución con MES 20 mM a pH 6-6,5, dependiendo del pI de la fusión scFv-TCR. Los scFv-TCR solubles y correctamente plegados se separaron de los mal plegados, los productos de degradación y las impurezas cargando las fracciones mezclas diluidas (en MES 20 mM a pH 6-6,5) en una columna de intercambio catiónico POROS 50HS y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl 0-500 mM en 6 volúmenes de columna usando un purificador Akta (GE Healthcare). Las fracciones de los picos (que eluían a una conductividad de -10 mS/cm) se almacenaron a 4 °C.

Etapas final de purificación

Las fracciones de los picos de la segunda etapa de purificación se analizaron por SDS-PAGE teñido con colorante Instant Blue (Novexin) antes de mezclarlas. Después, las fracciones mezcladas se concentraron para la etapa final de purificación, después el scFv-TCR soluble se purificó y caracterizó usando una columna de filtración en gel Superdex S200 (GE Healthcare) preequilibrada en tampón de PBS (Sigma). El pico que eluía a un peso molecular relativo de aproximadamente 78 kDa se analizó por SDS-PAGE teñido con colorante Instant Blue (Novexin) antes de mezclarlo.

La construcción preparada de acuerdo con el ejemplo 6 anterior, se puede variar sustituyendo la secuencia conectora GGGGS SEQ ID No: 48 por una secuencia conectora alternativa, por ejemplo seleccionada de GGGSG SEQ ID No: 49, GGSGG SEQ ID No: 50, GSGGG SEQ ID No: 51, y GGEGGGSEGGGS SEQ ID No: 47, y/o sustituyendo el aminoácido D1 de la SEQ ID No: 36 por A, y/o sustituyendo el aminoácido I2 de la SEQ ID No: 36 por Q, y/o sustituyendo el aminoácido S1 de la SEQ ID No: 8 por A o G. En otra variación, la secuencia del dominio variable beta que forma parte de la SEQ ID No: 36 se puede cambiar de SEQ ID No: 27 a las SEQ ID No: 13, 17, 23 o 26.

Ejemplo 7

Ensayo de citotoxicidad no radiactivo

Este ensayo es una alternativa colorimétrica a los ensayos de citotoxicidad de liberación de ^{51}Cr y mide de forma cuantitativa la lactato deshidrogenasa (LDH) que es una enzima que es liberada tras la lisis celular. La LDH liberada en líquidos sobrenadantes de cultivo se mide con un ensayo enzimático acoplado de 30 min, que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto de formazán rojo. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas. Los datos de absorbancia se recogen usando un lector de placa de 96 pocillos estándar a 490 nm.

Materiales

- El ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox96® (Promega) (G1780) contiene mezcla de sustrato, tampón de ensayo, solución de lisis y solución de parada

- Medio de ensayo: FCS al 10 % (inactivado con calor, Gibco, nº de cat. 10108-165), RPMI 1640 sin rojo fenol al 88 % (Invitrogen, nº de cat. 32404014), glutamina al 1 %, 200 mM (Invitrogen, nº de cat. 25030024), penicilina/estreptomicina al 1 % (Invitrogen nº de cat. 15070063)

- Placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo MicroWell Nunc (Nunc, nº de cat. 163320)

- Inmunoplasmas Nunc Maxisorp (Nunc, nº de cat. 442404)

Método

Preparación de células diana

Las células diana usadas en este ensayo eran de líneas de células tumorales Mel526 (línea celular de melanoma HLA-A2⁺ gp100⁺) y A375 (línea celular de melanoma HLA-A2⁺ gyp100). Las células diana se prepararon en medio de ensayo: la concentración de células diana se ajustó a 2×10^5 células/ml para dar 1×10^4 células/pocillo en 50 µl.

Preparación de células efectoras

Las células efectoras usadas en este ensayo eran CMSP (células mononucleares de sangre periférica). La relación de efector a diana usada era 50:1 (1×10^7 células/ml para dar 5×10^5 células/pocillo en 50 µl).

Preparación de reactivo/compuesto de ensayo

Se prepararon concentraciones variadas de la fusión scFv anti-CD3-TCR gp100 (de 30 nM a 0,03 pM) por dilución en medio de ensayo. La fusión scFv anti-CD3-TCR gp100 se preparó de acuerdo con el ejemplo 6.

Preparación del ensayo

Los constituyentes del ensayo se añadieron a la placa en el siguiente orden:

- 50 µl de células diana (preparadas como se ha explicado previamente) a cada pocillo

- 50 µl de células efectoras (preparadas como se ha explicado previamente) a cada pocillo

- 50 µl de reactivo (preparado como se ha explicado previamente) a cada pocillo.

Se prepararon varios testigos como se explica a continuación:

- Liberación espontánea de efectoras: 50 µl de células efectoras solas.

- Liberación espontánea de células diana: 50 µl de células diana solas.

- Liberación máxima de la diana: 50 µl de células diana solas.

5 - Testigo de medio de ensayo: 150 µl de medio solo.

- Testigo de volumen de medio de ensayo para solución de lisis: 150 µl de medio solo.

Todos los pocillos se preparan por triplicado en un volumen final de 150 µl.

10 La placa se centrifugó a 250 x g durante 4 min y después se incubó a 37 °C durante 24 h. 45 min antes de la recolección del líquido sobrenadante, se añadieron 15 µl de solución de lisis a los pocillos de liberación máxima de células diana y de testigo de volumen de medio de ensayo.

15 La placa se centrifugó a 250 x g durante 4 min. Se transfirieron 50 µl de líquido sobrenadante de cada pocillo de la placa de ensayo al pocillo correspondiente de una placa Nunc Maxisorb de 96 pocillos de fondo plano. La mezcla de sustrato se reconstituyó usando tampón de ensayo (12 ml). Después se añadieron 50 µl de la mezcla de sustrato reconstituida a cada pocillo de la placa. La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 50 µl de solución de parada a cada pocillo de la placa para detener la reacción. Se registró la absorbancia a 490 nm en un lector de placa de ELISA en el transcurso de 1 h después de añadir la solución de parada.

Cálculo de los resultados

25 Se restó la media de los valores de absorbancia del valor base del medio de cultivo de todos los valores de absorbancia experimental, liberación espontánea de células diana y liberación espontánea de células efectoras.

Se restó la media de los valores de absorbancia del testigo de corrección de volumen de los valores de absorbancia para el testigo de liberación máxima de células diana.

30 Los valores corregidos obtenidos en las dos primeras etapas se usaron en la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de citotoxicidad:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = 100 \times (\text{experimental} - \text{espontáneo efectoras} - \text{espontáneo diana}) / (\text{máximo diana} - \text{espontáneo diana})$$

35 Resultados

La gráfica en la figura 7 muestra la muerte específica de células de melanoma por linfocitos T redirigidos por scFv anti-CD3-TCR de alta afinidad para gp100 (preparado como se ha explicado en el ejemplo 6) que se une específicamente a células que presentan gp100 (células Mel526).

40

Ejemplo 8

Transfección de linfocitos T con variantes de alta afinidad de TCR gp100 natural

45 (a) *Preparación de vector lentivírico por transfección transitoria mediada por Express-In de células 293T*

Se usa un sistema de empaquetamiento lentivírico de 3ª generación para empaquetar vectores lentivíricos que contienen el gen que codifica el TCR deseado. Se transfectaron células 293T con 4 plásmidos (un vector lentivírico que contiene el gen de ORF individual de cadena alfa de TCR-P2A-cadena beta de TCR descrito en el ejemplo 8c, y 3 plásmidos que contienen los otros componentes necesarios para construir partículas lentivíricas infecciosas pero no reproductoras) usando la transfección mediada por *Express-In* (Open Biosystems). Para la transfección se toma un matraz T150 de células 293T en fase de crecimiento exponencial, con las células distribuidas uniformemente en la placa y ligeramente más del 50% de confluencia. Se llevan partes alícuotas de *Express-In* a temperatura ambiente. Se ponen 3 ml de medio exento de suero (RPMI 1640 + HEPES 10 mM) en un tubo cónico estéril de 15 ml. Se añaden 174 µl de reactivo *Express-In* directamente al medio exento de suero (esto proporciona una relación en peso de reactivo a ADN de 3,6:1). Se mezcla completamente invirtiendo los tubos 3-4 veces y se incuban a temperatura ambiente durante 5-20 min.

60 En un microtubo de 1,5 ml separado, se añaden 15 µg de ADN plasmídico a las partes alícuotas de la mezcla de empaquetamiento previamente mezclada (que contiene 18 µg de pRSV.REV (plásmido de expresión Rev), 18 µg de pMDLg/p.RRE (plásmido de expresión Gag/Pol), 7 µg de pVSV-G (plásmido de expresión de glicoproteína VSV), normalmente -22 µl, y se pipetea arriba y abajo para asegurar la homogeneidad de la mezcla de ADN. Se añade gota a gota ~1 ml de *Express-In*/medio exento de suero a la mezcla de ADN y después se pipetea arriba y abajo

antes de volver a transferirlo al resto de *Express-In*/medio exento de suero. Se invierte el tubo 3-4 veces y se incuba a temperatura ambiente durante 15-30 min.

Se separa el medio de cultivo antiguo del matraz de células. Se añade complejo de *Express-In*/medio/ADN (3 ml) al matraz directamente en la parte inferior de un matraz en posición vertical de células 293T. El matraz se pone plano lentamente para cubrir las células y el matraz se balancea muy suavemente para asegurar una distribución uniforme. Después de 1 min se añaden 22 ml de medio de cultivo reciente (R_{10} +HEPES: RPMI 1640, FBS inactivado por calor al 10 %, Pen/Strep/L-glutamina al 1 %, HEPES 10 mM) y se devuelve lentamente al incubador. Se incuba durante la noche a 37 °C/5 % de CO₂. Después de 24 h, se procede a recoger el medio que contiene los vectores lentivíricos empaquetados.

Para recoger los vectores lentivíricos empaquetados, se filtra el líquido sobrenadante del cultivo celular a través de un filtro de jeringa de nailon de 0,45 micrómetros, se centrifuga el medio de cultivo a 10.000 g durante 18 h (o 112.000 g durante 2 h), se separa la mayor parte del líquido sobrenadante (hay que tener cuidado de no alterar el sedimento) y se vuelve a suspender el sedimento en el resto de los pocos ml de líquido sobrenadante (normalmente aproximadamente 2 ml de un volumen inicial de 31 ml por tubo). Congelar instantáneamente en hielo seco en partes alícuotas de 1 ml y conservar a -80°C.

(b) Transducción de linfocitos T con vectores lentivíricos empaquetados que contienen el gen de interés

Antes de la transducción con los vectores lentivíricos empaquetados, se aíslan linfocitos T humanos (CD8 o CD4 o ambos, dependiendo de los requisitos) de sangre de voluntarios sanos. Estas células se cuentan y se incuban durante la noche en R_{10} que contiene IL-2 50 U/ml con 1×10^6 células por ml (0,5 ml/pocillo) en placas de 48 pocillos con microperlas recubiertas de anticuerpo dirigido contra CD3/CD28 prelavadas (Dyna T cell expander, Invitrogen) con una relación de 3 perlas por célula.

Después de estimulación durante la noche, se añaden 0,5 ml de vector lentivírico empaquetado solo a las células deseadas. Se incuba a 37 °C/5 % de CO₂ durante 3 días. 3 días después de la transducción se cuentan las células y se diluyen hasta $0,5 \times 10^6$ células/ml. Se añade medio reciente que contiene IL-2 según sea necesario. Las perlas se separan 5-7 días después de transducción. Se cuentan las células y se sustituye o se añade medio reciente que contiene IL-2 a intervalos de 2 días. Las células se mantienen entre $0,5 \times 10^6$ y 1×10^6 células/ml. Las células se pueden analizar por citometría de flujo desde el día 3 y usar para ensayos funcionales (por ejemplo, ELISPOT para la liberación de IFN γ) a partir del día 5. A partir del día 10, o cuando las células se dividen lentamente y se reducen de tamaño, las células se congelan en partes alícuotas de al menos 4×10^6 células/vial (con 1×10^7 células/ml en FBS al 90 %/DMSO al 10 %) para el almacenamiento.

(c) Gen de TCR natural (wt) para la transfección de linfocitos T por los métodos (a) y (b) anteriores

La figura 8A es una secuencia de ADN (SEQ ID No: 37) que codifica el TCR gp100 natural (codón optimizado para la expresión máxima en células humanas). Es una construcción de marco de lectura abierto individual de cadena alfa de longitud completa (TRAV17)-tescovirus porcino-1 2A-cadena beta de longitud completa (TRBV19). La secuencia 2A está subrayada, y está precedida por los nucleótidos que codifican un sitio de escisión de furina para ayudar a la eliminación proteolítica de la secuencia 2A (descrito más adelante en relación con la Fig 8B (SEQ ID No: 38)). La omisión del enlace peptídico durante la traducción de la proteína del ARNm en el extremo 3' de la secuencia 2A produce dos proteínas: 1) fusión de cadena alfa de TCR-2A. 2) cadena beta de TCR. La SEQ ID No: 37 (figura 8A) incluye sitios de restricción *NheI* y *Sall* (subrayados).

La figura 8B es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No: 38) que corresponde a la figura 8A

En la figura 8B:

M1-N20 es una secuencia líder que es eliminada en la maduración de la cadena alfa del TCR natural;

S21-S223 corresponde a la secuencia de la cadena alfa natural de SEQ ID No: 2;

S21-R250 corresponde al dominio extracelular de la cadena alfa natural;

I251-L267 es la región transmembrana de la cadena alfa del TCR maduro;

W268-S270 es la región intracelular de la cadena alfa del TCR maduro;

R273-R276 es el sitio de escisión de furina para ayudar a la eliminación proteolítica, en el aparato de Golgi, de la secuencia de PSA A281-P299;

G271, S272, S277 a G280, R300 son conectores flexibles que permiten la función completa de la escisión por la furina y secuencias P2A;

M301-V319 es una secuencia líder que es eliminada en la maduración de la cadena beta de TCR natural;

D320-D561 corresponde a la secuencia de la cadena beta natural de SEQ ID No: 3;

D320-E581 corresponde al dominio extracelular de la cadena beta natural;

I582-V603 es la región transmembrana de la cadena beta del TCR maduro;

K604-G610 es la región intracelular de la cadena beta del TCR maduro.

(d) Linfocitos T transfectados con TCR gp100 natural y de alta afinidad

Siguiendo los procedimientos descritos en (a) y (b) anteriores, se insertó el gen de gp100 alfa wt-2A-beta wt TCR (SEQ ID No 37 (Fig 8A)) en el lentivector pELNSxv usando los sitios de restricción *NheI* y *Sall* únicos para ambas construcciones de ADN, y se crearon linfocitos T transfectados.

Igualmente, se pueden crear linfocitos T por transfección con genes idénticos a SEQ ID No 37 (Fig 8A) excepto que codifican (a) los TCR con la secuencia del dominio variable (S1 a A109) de la cadena alfa natural de SEQ ID No 2, asociada con el dominio variable de la cadena beta que tiene una de las SEQ ID No: 10-35; o (b) un dominio variable de la cadena alfa que tiene una de las SEQ ID No: 7-9 asociada con la secuencia del dominio variable (D1 a T112) de la cadena beta natural de SEQ ID No 3; o (c) un dominio variable de la cadena alfa que tiene una de las SEQ ID No: 7-9 asociada con el dominio variable de la cadena beta que tiene una de las SEQ ID No: 10-35.

Ejemplo 9

Activación mayor de linfocitos T transducidos con TCR con afinidad mejorada para gp100 comparado con linfocitos T transducidos con TCR de afinidad natural en respuesta a líneas de células tumorales

Protocolo ELISPOT

El siguiente ensayo se llevó a cabo para demostrar la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL) transducidos con TCR en respuesta a líneas de células tumorales. La producción de IFN- γ , medida usando el ensayo de ELISPOT, se usó como una lectura de la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL).

Reactivos

Medio de ensayo: FCS al 10 % (Gibco, nº de cat. 2011-09), RPMI 1640 al 88 % (Gibco, nº de cat. 42401), glutamina al 1 % (Gibco nº de cat. 25030) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco nº de cat. 15070-063).

Tampón de lavado: PBS 0,01 M/Tween 20 al 0,05 %

PBS (Gibco nº de cat. 10010)

El kit enzimático IFN γ humano ELISPOT PVDF (Diacclone, Francia; nº de cat. 856.051.020) contiene todos los reactivos necesarios (anticuerpos de captura y de detección, leche en polvo desnatada, BSA, estreptavidina-fosfatasa alcalina y solución de BCIP/NBT así como las placas de 96 pocillos de PVDF de IFN- γ humano ELISPOT)

Método

Preparación de células diana

Las células diana usadas en este método eran células presentadoras de epítipo neutrales: melanoma Mel526, melanoma Mel624, MeWo y SKMel5, que son todas HLA-A2⁺ gp100⁺. Se usó melanoma A375 (HLA-A2⁺ gp100⁻) como línea celular testigo negativo. Se determinó que los hepatocitos primarios humanos HLA-A2⁺ (lote de HEP2, obtenido de ScienCell) eran gp100⁻ (no se detectó expresión de ARNm de gp100 por RT-PCR) y se usaron como testigo negativo. Se lavaron suficientes células diana (50.000 células/pocillo) por centrifugación 3 veces a 1200 rpm, 10 minutos en un dispositivo Megafuge 1.0 (Heraeus). Después las células se volvieron a suspender en medio de ensayo con 10⁶ células/ml.

Preparación de células efectoras

Las células efectoras (linfocitos T) usadas en este método eran una mezcla de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ 1:1 (obtenida por selección negativa (usando kits de aislamiento negativo de CD4 y CD8, Dynal) de PBL). Las células se estimularon con perlas recubiertas con antiCD3/CD28 (T cell expander, Invitrogen), se transdujeron con lentivirus que llevaban el gen que codifica el TCR $\alpha\beta$ de longitud completa de interés (basado en la construcción descrita en el

ejemplo 8 y mostrada en la Fig. 8B) y se expandieron en medio de ensayo que contenía IL-2 50 U/ml hasta entre 10 y 13 días después de transducción. Después, las células se pusieron en medio de ensayo antes de lavarlas por centrifugación a 1200 rpm, 10 minutos en un dispositivo Megafuge 1.0 (Heraeus). Las células después se volvieron a suspender en medio de ensayo a 4X la concentración final requerida.

5

ELISPOT

Las placas se prepararon como sigue: se diluyeron 100 µl de anticuerpo de captura dirigido contra IFN-γ en 10 ml de PBS estéril por placa. Después se repartieron en partes alícuotas en cada pocillo 100 µl del anticuerpo de captura diluido. Después las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de incubación, las placas se lavaron (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) para separar el anticuerpo de captura. Después las placas se bloquearon por adición de 100 µl de leche desnatada al 2% en PBS estéril a cada pocillo e incubación de las placas a temperatura ambiente durante 2 h. Después, la leche desnatada se lavó de las placas (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) y se eliminó cualquier tampón de lavado restante sacudiendo y golpeando las placas ELISPOT sobre una toalla de papel.

Después se añadieron los constituyentes del ensayo a la placa ELISPOT en el siguiente orden:

- 50 µl de células diana 10^6 células/ml (dando un total de 50.000 células diana/pocillo).
- Se pueden añadir 50 µl de TCR gp100 de alta afinidad soluble (1,2 µM para dar una concentración final de 300 nM) para bloquear la activación específica de gp100 de los linfocitos T transducidos con TCR.
- Medio suficiente para dar un volumen final de 200 µl por pocillo (medio de ensayo).
- 50 µl de células efectoras (5.000 CD4/8⁺ células/pocillo mezcladas).

Después las placas se incubaron durante la noche (37 °C/5% de CO₂). Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) con tampón de lavado y se golpearon sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Después, se añadieron 100 µl de anticuerpo de detección primario a cada pocillo. El anticuerpo de detección primario se preparó por adición de 550 µl de agua destilada a un vial de anticuerpo de detección suministrado con el kit de Diaclone. Después se diluyeron 100 µl de esta solución en 10 ml de PBS/BSA al 1% (el volumen necesario para una sola placa). Después las placas se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 h antes de lavarlas tres veces (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) con el tampón de lavado, se eliminó el exceso de tampón de lavado golpeando la placa sobre una toalla de papel.

La detección secundaria se llevó a cabo añadiendo 100 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida a cada pocillo e incubando la placa a temperatura ambiente durante 1 h. La estreptavidina-fosfatasa alcalina se preparó por adición de 10 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina a 10 ml de PBS/BSA al 1% (el volumen necesario para una sola placa). Después las placas se lavaron tres veces (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) con tampón de lavado y se golpearon sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Después, se añadieron 100 µl de solución de BCIP/NBT, suministrada con el kit Diaclone, a cada pocillo. Durante el desarrollo, las placas se recubrieron con papel de aluminio y se dejaron durante 5-15 min. Se comprobó regularmente en el desarrollo de las placas las manchas durante este periodo para determinar el tiempo óptimo para terminar la reacción. Las placas se lavaron en una pila llena de agua corriente para terminar el desarrollo de la reacción, y se secaron sacudiéndolas antes de desmontarlas en sus 3 partes constituyentes. Después, las placas se secaron a 50 °C durante 1 h antes de contar las manchas que se habían formado sobre la membrana usando un lector de placa Immunospot (CTL; Cellular Technology Limited).

50

Resultados

La liberación de IFNγ por linfocitos T transducidos por TCR activados en respuesta a una variedad de líneas de células tumorales positivas para gp100 y testigo o hepatocitos testigo, se ensayó por el ensayo ELISPOT (como se ha descrito antes). El número de manchas en ELISPOT observadas en cada pocillo se representó gráficamente usando Prism (Graph Pad).

Se incubaron linfocitos T mezcla CD4⁺/CD8⁺ que expresaban a) TCR No: 1 (secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 38), b) TCR No: 2, o c) TCR No: 3, basado en la construcción descrita en el ejemplo 8 y mostrada en la figura 8b, pero que tiene los dominios variables de la cadena alfa y la cadena beta de TCR como se describe en la siguiente tabla, con las líneas de células tumorales gp100⁺ HLA-A2⁺ Mel526, Mel624, SKMel5, o MeWo o con A375 o HEP2 gp100⁺ HLA-A2⁺. El bloqueo específico de gp100 se llevó a cabo por adición del TCR gp100 300 nM del ejemplo 4 (preparado como se describe en el ejemplo 2) que tiene el Vα de SEQ ID No: 8 y el Vβ de SEQ ID No: 27.

60

TCR N°	dominio variable de α de TCR de SEQ ID No:	dominio variable de β de TCR de SEQ ID No:
1	S1 a A109 de SEQ ID No: 2	D1 a T112 de SEQ ID No: 3
2	8	D1 a T112 de SEQ ID No: 3
3	S1 a A109 de SEQ ID No: 2	33

La figura 9a demuestra que los linfocitos T transducidos con el TCR N°: 1 liberaban IFN γ en respuesta solo a la líneas de melanoma Mel526, Mel624 y SKMel5, que eran bloqueadas eficazmente por el TCR gp100 300 nM del ejemplo 4 que tiene la secuencia de V α de ID No: 8 y la secuencia de V β de ID No: 27.

Los linfocitos T transducidos con el TCR de afinidad mejorada para gp100 N°: 2 mostraron una respuesta mayor a estas líneas de células tumorales que eran bloqueadas eficazmente por TCR gp100 300 nM del ejemplo 4 que tiene la secuencia de V α de ID No: 8 y la secuencia de V β de ID No: 27. La figura 9b demuestra que los linfocitos T transducidos con el TCR N°: 1 liberaban IFN γ en respuesta a las células MEI526, que era eficazmente bloqueada por TCR gp100 300 nM. La liberación de IFN γ era muy pobre frente a las células MeWo.

Los linfocitos T transducidos con el TCR N°: 2 y los linfocitos T transducidos con el TCR N°: 3 mostraron una mayor respuesta tanto a las células Mel526 como MeWo, que era eficazmente bloqueada por TCR gp100 300 nM.

Ejemplo 10

Evaluación de la potencia de varias fusiones TCR gp100-anti-CD3 que tienen una variedad de afinidades del TCR

Protocolo de ELISPOT

El siguiente ensayo se llevó a cabo para comparar la potencia de diferentes proteínas de fusión de TCR gp100-anti-CD3 en la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) en respuesta a una línea de células tumorales que presenta el complejo péptido gp100-HLA-A2. La producción de IFN, medida usando el ensayo ELISPOT, se usó como una lectura de la activación de linfocitos T. El ensayo ELISPOT se describe en el ejemplo 9 previo.

Reactivos

El medio de ensayo, tampón de lavado, PBS y kit enzimático IFN γ humano ELISPOT PVDF se usaron como se describe en el ejemplo 9.

Método

Preparación de células diana

Las células diana usadas en este método eran células presentadoras de epítipo neutrales, células de melanoma Mel526 que son HLA-A2⁺ gp100⁺. Se lavaron suficientes células diana (50.000 células/pocillo) por centrifugación una vez a 1200 rpm, 10 min en un dispositivo Megafuge 1.0 (Heraeus). Después las células se volvieron a suspender en medio de ensayo con 10⁶ células/ml.

Preparación de células efectoras

Las células efectoras (linfocitos T) usadas en este método eran linfocitos T CD8⁺ (obtenidos por selección negativa (usando kits de aislamiento negativo de CD8, Dynal, n° de cat. 113.19) de PBL). Las células efectoras se descongelaron en medio de ensayo antes de lavarlas por centrifugación a 1200 rpm, 10 min en un dispositivo Megafuge 1.0 (Heraeus). Las células después se volvieron a suspender en medio de ensayo a 4X la concentración final requerida.

Preparación del reactivo/compuesto de ensayo

Se prepararon concentraciones variadas de cada TCR gp100-scFv (de 10 nM a 0,1 μ M) por dilución en medio de ensayo para dar 4x la concentración final. Las fusiones de TCR gp100-scFv ensayadas se identifican en la sección de resultados y se prepararon como se describe en el ejemplo 6.

ELISPOT

Las placas se prepararon como se describe en el ejemplo 9.

Después se añadieron los constituyentes del ensayo a la placa ELISPOT en el siguiente orden:

50 µl de células diana 10^6 células/ml (dando un total de 50.000 células diana/pocillo)

50 µl de reactivo (las fusiones TCR-anti-CD3; concentraciones variadas)

5 50 µl de medio (medio de ensayo)

50 µl de células efectoras (5.000 $CD8^+$ células/pocillo).

10 Después las placas se incubaron durante la noche (37 °C/5% de CO_2). El lavado de las placas, preparación del anticuerpo primario y detección con un anticuerpo primario, se llevaron a cabo como se explica en el ejemplo 9.

La detección secundaria y el desarrollo se llevaron a cabo como se explica en el ejemplo 9. Las placas después se secaron a 50°C durante 1 h antes de contar las manchas que se habían formado en la membrana usando un lector de placa Immunospot (CTL; Cellular Technology Limited).

15 Resultados

20 Las fusiones TCR gp100-scFv anti-CD3 ensayadas en este ejemplo comprenden la secuencia de la cadena alfa de TCR gp100 de SEQ ID No: 45 que tiene el dominio variable (aminoácidos 1 a 109) de SEQ ID No: 2 (aminoácidos 1 a 109) o la secuencia de la cadena alfa de TCR gp100 de SEQ ID No: 45 pero que tiene el dominio variable (aminoácidos 1 a 109) de SEQ ID No: 8 (con X = S), y la fusión cadena beta de TCR gp100-scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 36, pero en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente, y en el que los restos de aminoácidos 108 a 131 se sustituyen por un conector variante, en concreto RTSGPGDGGKGGPGKGGGEGTKGTGPGG (SEQ ID No: 44), y los restos de aminoácidos 254 a 258 se sustituyen por un conector variante, en concreto GGEGGGSEGGGS (SEQ ID No: 47), que tiene el dominio variable de la cadena beta de SEQ ID No: 27 que se puede cambiar al dominio variable de SEQ ID No: 3 (D1 a T112 de SEQ ID No: 3), o el dominio variable de SEQ ID No: 13, o el dominio variable de SEQ ID No: 17, o el dominio variable de SEQ ID No: 23, o el dominio variable de SEQ ID No: 26, como se muestra en la siguiente tabla. Las fusiones TCR-anti-CD3 se prepararon como se describe en el ejemplo 6.

30 El número de manchas de ELISPOT en cada pocillo se representó gráficamente frente a la concentración de la construcción de la fusión usando Prism (Graph Pad). A partir de estas curvas de dosis-respuesta, se determinaron los valores de CE_{50} (las CE_{50} se determinan a la concentración de la fusión TCR-anti-CD3 que induce 50 % de la respuesta máxima).

35 La gráfica en la figura 10 muestra la activación específica de linfocitos T $CD8^+$ por las fusiones TCR gp100-anti-CD3 que se unen específicamente a células que presentan gp100. La siguiente tabla muestra la CE_{50} de cada fusión TCR gp100-anti-CD3 así como la mejora en la afinidad de TCR/péptido-HLA comparada con la de TCR WT (TCR N°: 1).

TCR N°	Dominio variable de cadena alfa de TCR de SEQ ID	Dominio variable de cadena beta de TCR de SEQ ID	Mejora de afinidad	CE_{50}
1	2 (1-109)	3 (1-112)	-	No determinado *
2	8	3 (1-112)	3.7	No determinado*
3	2 (1-109)	13	492	1,928e-9
4	2 (1-109)	17	698	1,232e-9
5	2 (1-109)	23	7.692	3,129e-10
6	2 (1-109)	26	93.750	6,540e-11
7	8	27	1.000.000	3,995e-11

40 * Nota: A la concentración más alta de la fusión ensayada, la señal máxima con la fusión TCR WT (TCR N°: 1)-anti-CD3 era menos de 20 % de la señal observada para TCR N°: 7-anti-CD3 y por consiguiente el valor de CE_{50} para TCR N°: 1-anti-CD3 no se podía determinar de forma fiable. A la concentración más alta de la fusión TCR N°: 2-anti-CD3 ensayada, la activación de linfocitos T no alcanzó un máximo y por consiguiente el valor de CE_{50} no se podía determinar de forma fiable.

45 En general, este experimento indica que las fusiones TCR-anti-CD3 con restos de TCR con mayor afinidad daban mejor activación de linfocitos T $CD8^+$. Estos resultados demuestran una correlación entre la afinidad del TCR por el complejo péptido gp100-HLA-A2 y la potencia de la fusión TCR-anti-CD3 para activar linfocitos T $CD8^+$. La fusión TCR N°: 7-anti-CD3 demostró una potencia superior comparado con las otras fusiones de TCR ensayadas.

50 Ejemplo 11

Ensayo de redirección de linfocitos T que ensaya la potencia de las fusiones de gp100-anti-CD3 de alta afinidad

Protocolo de ELISPOT

- 5 El siguiente ensayo se llevó a cabo para comparar la potencia de diferentes proteínas de fusión TCR gp100-anti-CD3 en la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) en respuesta a una línea de células tumorales que presenta el complejo péptido gp100-HLA-A2. La producción de IFN γ , medida usando el ensayo ELISPOT, se usó como una lectura de la activación de linfocitos T.
- 10 *Reactivos*

Medio de ensayo: FBS al 10 % (inactivado con calor) (Sera Laboratories International, n° de cat. EU-000-F1), RPMI 1640 al 88 % (Invitrogen, n° de cat. 42401018), L-glutamina al 1 % (Invitrogen, n° de cat. 25030024) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Invitrogen, n° de cat. 15070063).
- 15

Tampón de lavado: PBS 0,01 M, un sobre diluido en 1 litro de agua desionizada (Sigma, n° de cat. P3813)/ Tween 20 al 0,05 % (Sigma, n° de cat. P7949)

PBS (Invitrogen, n° de cat. 10010015)
- 20

Tampón de dilución: PBS (Invitrogen, n° de cat. 10010015) que contiene FBS al 10 % FBS (inactivado con calor) (Sera Laboratories International, n° de cat. EU-000-F1)

El kit enzimático IFN γ humano ELISPOT PVDF (10 placas) (BD; n° de cat. 551849) que incluye placas de 96 pocillos de PVDF ELISPOT, anticuerpo de captura, anticuerpo de detección y estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante)
- 25

Conjunto de reactivo sustrato AEC (BD, n° de cat. 551951)
- 30 *Método*

Preparación de células diana

Las células diana usadas en este método eran células presentadoras de epítipo neutrales, células de melanoma Mel526 que son HLA-A2⁺ gp100⁺. Se usó melanoma A375 (HLA-A2⁺ gp100⁻) como línea celular de testigo negativo. Se lavaron suficientes células diana (50.000 células/pocillo) por centrifugación una vez a 1200 rpm, 10 min en un dispositivo Megafuge 1.0 (Heraeus). Después las células se volvieron a suspender en medio de ensayo con 10⁶ células/ml.
- 40

Preparación de células efectoras

Las células efectoras (linfocitos T) usadas en este método eran linfocitos T CD8⁺ (obtenidos por selección negativa (usando kits de aislamiento negativo de CD8, Dynal, n° de cat. 113.19) de PBL). Las células efectoras se descongelaron en medio de ensayo antes de lavarlas por centrifugación a 1200 rpm, 5 min en un dispositivo Megafuge 1.0 (Heraeus). Las células después se volvieron a suspender en medio de ensayo a 1,6x10⁵ células por ml para dar 8.000 células por pocillo en 50 μ l.
- 45

Preparación del reactivo/compuesto de ensayo
- 50

Se prepararon concentraciones variadas de cada TCR gp100-scFv (de 10 nM a 0,1 μ M) por dilución en medio de ensayo para dar 4x la concentración final. Las fusiones de TCR gp100-scFv ensayadas se identifican en la sección de resultados y se prepararon como se describe en el ejemplo 6.
- 55 *ELISPOT*

Las placas se prepararon como sigue: se diluyeron 50 μ l de anticuerpo de captura dirigido contra IFN- γ en 10 ml de PBS estéril por placa. Después se repartieron en partes alícuotas en cada pocillo 100 μ l del anticuerpo de captura diluido. Después las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de incubación, las placas se bloquearon sacudiendo el anticuerpo de captura en la pila, con golpes suaves sobre un rodillo azul para separar el anticuerpo residual y después añadiendo 200 μ l de medio de ensayo a cada pocillo e incubando las placas a temperatura ambiente durante 2 h. Después, se eliminó el medio de ensayo de bloqueo sacudiendo el medio en la pila y se eliminó cualquier medio restante con golpes suaves en las placas ELISPOT sobre una toalla de papel.
- 60

Después se añadieron los constituyentes del ensayo a la placa ELISPOT en el siguiente orden:
- 65

50 µl de células diana 10^6 células/ml (dando un total de 50.000 células diana/pocillo)

50 µl de reactivo (las fusiones TCR-anti-CD3; concentraciones variadas)

5 50 µl de medio (medio de ensayo)

50 µl de células efectoras (8.000 CD8⁺ células/pocillo).

10 Después las placas se incubaron durante la noche (37 °C/5% de CO₂). Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) con tampón de lavado y se golpearon sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de tampón de lavado. Después, se añadieron 100 µl de anticuerpo de detección primario a cada pocillo. El anticuerpo de detección primario se preparó por adición de 40 µl a 10 ml de tampón de dilución (el volumen necesario para una sola placa). Después las placas se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 h, antes de lavarlas tres veces (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) con tampón de lavado, se eliminó el exceso de tampón de lavado golpeando la placa sobre una toalla de papel.

20 La detección secundaria se llevó a cabo añadiendo 100 µl de estreptavidina-HRP diluida a cada pocillo e incubando la placa a temperatura ambiente durante 1 h. La estreptavidina-HRP se preparó por adición de 100 µl de estreptavidina-HRP a 10 ml de tampón de dilución (el volumen necesario para una sola placa). Después las placas se lavaron tres veces (programa 1, placa tipo 2, lavador de placa de 96 pocillos Ultrawash Plus; Dynex) con tampón de lavado, seguido de dos lavados con PBS que se añadió con pipeta manualmente añadiendo 200 µl por pocillo y sacudiendo en la pila. La placa se golpeó sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de PBS. Después se añadieron 100 µl de reactivo sustrato AEC a cada pocillo. El sustrato se preparó por adición de 10 gotas de cromógeno AEC a 10 ml de tampón de AEC (el volumen requerido para una sola placa). Durante el desarrollo, las placas se recubrieron con papel de aluminio y se dejaron durante 5-15 min. Se comprobó regularmente en el desarrollo de las placas las manchas durante este periodo para determinar el tiempo óptimo para terminar la reacción. Las placas se lavaron con agua desionizada para terminar el desarrollo de la reacción, y se secaron golpeándolas antes de desmontarlas en sus 3 partes constituyentes. Después, las placas se secaron al aire a temperatura ambiente durante al menos 1 h antes de contar las manchas que se habían formado sobre la membrana usando un lector de placa Immunospot (CTL; Cellular Technology Limited).

Resultados

35 Las fusiones TCR gp100-scFv anti-CD3 ensayadas en este ejemplo se describen más adelante como proteínas 1, 2, 3 y 4.

40 La proteína 1 comprende la cadena alfa de TCR gp100 que tiene la secuencia SEQ ID No: 45 pero con el dominio variable de SEQ ID No: 8 donde X = S, y la cadena beta de TCR gp100-scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 36 pero siendo los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 D e I respectivamente.

45 La proteína 2 comprende la cadena alfa de TCR gp100 que tiene la secuencia SEQ ID No: 45 pero con el dominio variable de SEQ ID No: 8 donde X = G, pero con 8 restos de aminoácidos truncados en su extremo C (de F196 a S203 incluido), y la cadena beta de TCR gp100-scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 36 pero siendo los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 A y Q respectivamente

50 La proteína 3 comprende la cadena alfa de TCR gp100 que tiene la secuencia SEQ ID No: 45 pero con el dominio variable de SEQ ID No: 8 donde X = A, pero con 8 restos de aminoácidos truncados en su extremo C (de F196 a S203 incluido), y la cadena beta de TCR gp100-scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 36 pero siendo los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 A e I respectivamente.

55 La proteína 4 comprende la cadena alfa de TCR gp100 que tiene la secuencia SEQ ID No: 45 pero con el dominio variable de SEQ ID No: 8 donde X = G, pero con 8 restos de aminoácidos truncados en su extremo C (de F196 a S203 incluido), y la cadena beta de TCR gp100-scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 36 pero siendo los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 D e I respectivamente.

Las fusiones TCR-anti-CD3 se prepararon como se describe en el ejemplo 6.

60 La liberación de IFNγ por los linfocitos T CD8 activados redirigidos por las proteínas de fusión TCR gp100-anti-CD3 de alta afinidad se ensayó por el ensayo ELISPOT (como se ha descrito antes). El número de manchas en ELISPOT observadas en cada pocillo se representó gráficamente usando Prism (Graph Pad) (véase la figura 11). A partir de las curvas de dosis-respuesta, se determinaron los valores de CE50 (las CE50 se determinan a la concentración de la fusión TCR-anti-CD3 que induce 50 % de la respuesta máxima).

65 La gráfica en la figura 11 muestra la activación específica de linfocitos T CD8⁺ por las fusiones TCR gp100-anti-CD3

que se unen específicamente a células presentadoras de gp100. Este ensayo permite ensayar 4 proteínas de fusión TCR gp100-anti-CD3 que mostraban todas redirección eficaz de los linfocitos T y potencias muy similares como se muestra en la siguiente tabla.

Proteína nº	CE ₅₀
1	1,252e-10
2	2,69e-11
3	5,54e-11
4	3,149e-11

Ejemplo 12

Eficacia in vivo de la fusión gp100-anti-CD3 de alta afinidad

Las fusiones gp100 anti-CD3 de alta afinidad son específicas para el complejo péptido gp100 YLEPGPVTA-HLA-A2 humano y CD3 humano y no se unen al complejo péptido gp100-HLA o CD3 de ratón. Por lo tanto, la eficacia antitumoral se estudió en ratones inmunodeficientes con un modelo de xenoinjerto de melanoma humano.

Modelo de xenoinjerto Mel526 Beige/SCID

Se seleccionó la línea celular de melanoma humano Mel526 para el establecimiento de un modelo de xenoinjerto humano, puesto que las células Mel526 presentan el complejo péptido gp100-HLA-A2 y las fusiones gp100-anti-CD3 de alta afinidad demostraron la lisis redirigida de células Mel526 in vitro. Se usaron ratones Beige/SCID inmunodeficientes (deficientes en la función de linfocitos T, B, NK) en este modelo.

Injerto de células

Las células tumorales Mel526 (2×10^6 /ratón) se mezclaron con células CMSP humanas (5×10^6 /ratón) en PBS (200 μ l/ratón) y posteriormente se inyectaron en cada ratón el día 0. Las CMSP procedentes de 4 donantes humanos sanos se distribuyeron uniformemente entre los 6 grupos de 8 ratones.

Diseño del estudio:

Se trataron 8 animales por grupo por vía intravenosa con testigo con vehículo (PBS + suero murino) o la fusión TCR gp100-anti-CD3 de alta afinidad durante 5 días consecutivos, empezando 1 h después de la inyección subcutánea de células tumorales Mel526 y CMSP o solo células Mel526. En la siguiente tabla se presentan detalles del diseño del estudio. La fusión TCR gp100-anti-CD3 ensayada en este experimento comprende una cadena alfa de TCR gp100 que contiene el dominio variable alfa de SEQ ID No: 8 (X = S) y la cadena beta de TCR gp100-scFv anti-CD3 de SEQ ID No: 36 en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente. Esta fusión TCR-anti-CD3 se preparó como se explica en el ejemplo 6.

Grupo	N	Células diana (Mel 526)	Células efectoras (CMSP)	Tratamiento	Dosis
1	8	2×10^6	-	Vehículo	-
2	8	2×10^6	5×10^6	Vehículo	-
3	8	2×10^6	5×10^6	fusión TCR gp100-anti-CD3	0,1 mg/kg
4	8	2×10^6	5×10^6	fusión TCR gp100-anti-CD3	0,04 mg/kg
5	8	2×10^6	5×10^6	fusión TCR gp100-anti-CD3	0,01 mg/kg
6	8	2×10^6	5×10^6	fusión TCR gp100-anti-CD3	0,004 mg/kg

Lectura del estudio

Se midieron el tamaño tumoral y el peso corporal a lo largo de todo el estudio (3 veces por semana) empezando el día de injerto del tumor/CMSP. Las dimensiones del tumor se determinaron por la medición de las longitudes y anchos usando un calibre externo. La longitud corresponde a la dimensión horizontal más larga del tumor y el ancho corresponde a la dimensión más corta del tumor. El volumen tumoral medio (media + DT; media + ETM) se calculó y se dio en una gráfica. Los datos de crecimiento tumoral se registraron para cada ratón identificado individualmente. El volumen tumoral se calculó usando la siguiente fórmula: $V = \text{longitud} \times \text{ancho}^2/2$.

Resultados

5 La figura 12 muestra el volumen tumoral medio en cada grupo de estudio. La inyección de células diana sin células efectoras seguido de tratamiento con vehículo (grupo 1) y la inyección de células diana con células efectoras seguido de tratamiento con vehículo (grupo 2) mostró el crecimiento tumoral medible empezando el día 11. La tasa de crecimiento de los tumores en el grupo 2 era similar a la tasa de crecimiento tumoral en el grupo 1.

10 El tratamiento con TCR gp100-anti-CD3 de alta afinidad mostró una eficacia terapéutica significativa en el crecimiento tumoral medible e indujo una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento del tumor MeI526 en presencia de células efectoras CMSP.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de linfocitos T (TCR) que tiene la propiedad de unirse al complejo YLEPGPVTA (SEQ ID No: 1)-HLA-A2 y que tiene:

(a) una secuencia del dominio variable de la cadena alfa al menos 90 %, al menos 93 % o al menos 94 % idéntica a los aminoácidos 1 a 109 de la SEQ ID No: 2, en la que restos de aminoácidos en una o más de las posiciones 94D, 97L, 98V o 102G están mutados, y una secuencia variable de la cadena beta de aminoácidos 1 a 112 de SEQ ID No: 3 excepto que restos de aminoácidos de una o más de las posiciones 27L, 28N, 29H, 30D, 31A, 50Q, 51I, 52V, 53N, 54D, 61A, 94S, 95I, 96G, 97G, 98P o 100E están mutados; o

(b) una secuencia del dominio variable de la cadena beta de una de las SEQ ID NO: 10-35 y una secuencia del dominio variable de la cadena alfa que es al menos 90 %, al menos 93 %, al menos 94 % o 100 % idéntica a los aminoácidos 1 a 109 de la SEQ ID NO: 2.

2. Un TCR según la reivindicación 1 (b), en el que la secuencia del dominio variable de la cadena alfa es al menos 90 %, al menos 93 % o al menos 94 % idéntica a los aminoácidos 1 a 109 de la SEQ ID No: 2, en la que restos de aminoácidos en una o más de las posiciones 94D, 97L, 98V o 102G están mutados.

3. Un TCR según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene una afinidad de unión por y/o una semivida de unión por el complejo YLEPGPVTA-HLA-A2 al menos doble que la de un TCR que tiene la secuencia de la cadena alfa extracelular de SEQ ID NO: 45 y la secuencia de la cadena beta extracelular de SEQ ID NO: 46.

4. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa 94S, 94T, 94R, 97M, 98M, 98Q, 98G, 98S, 98A o 102D usando la numeración mostrada en la SEQ ID No: 2.

5. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta 27I, 28F, 29Q, 30K, 31K, 50W, 51A, 51G, 52Q, 52Y, 52T, 53G, 53F, 54N, 54H, 61T, 94L, 95Y, 95H, 95W, 95F, 95S, 95V, 96C, 97E, 97A, 98G, 100Q o 100P usando la numeración mostrada en la SEQ ID No: 3.

6. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de SEQ ID No: 7, 8 y 9.

7. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de SEQ ID No: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35.

8. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un TCR heterodímero $\alpha\beta$, y que tiene secuencias del dominio constante de las cadenas alfa y beta en los que la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 están mutadas ambas en cisteína, formando dichas cisteínas un enlace disulfuro entre los dominios constantes alfa y beta del TCR.

9. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un TCR heterodímero $\alpha\beta$, y que tiene secuencias del dominio constante de las cadenas alfa y beta en las que las secuencias del dominio constante están unidas por el enlace disulfuro natural entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

10. Un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está asociado con un marcador detectable, un agente terapéutico, un resto modificador de la PK o una combinación de cualquiera de estos.

11. Un TCR según la reivindicación 10, en el que el agente terapéutico es un anticuerpo dirigido contra CD3 unido covalentemente al extremo C o N de la cadena alfa o beta del TCR.

12. Un complejo de TCR multivalente que comprende al menos dos TCR según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

13. ADN o ARN que codifican un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

14. Una célula aislada que presenta un TCR según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

15. Un TCR según la reivindicación 11, que comprende:

una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa del TCR seleccionada del grupo que consiste en:

(i) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la

secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es S;

(ii) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es A;

(iii) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es G;

(iv) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es S, y el extremo C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 a S203 incluido, basado en la numeración de la SEQ ID No: 45;

(v) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es A, y el extremo C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 a S203 incluido, basado en la numeración de la SEQ ID No: 45;

(vi) la secuencia de la cadena alfa del TCR de SEQ ID No: 45, en la que los aminoácidos 1 a 109 se sustituyen por la secuencia SEQ ID No: 8, en la que el aminoácido en la posición 1 es G, y el extremo C de la cadena alfa está truncado en 8 aminoácidos desde F196 a S203 incluido, basado en la numeración de la SEQ ID No: 45;

y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta del TCR-anti-CD3 seleccionada del grupo que consiste en:

(vii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 de SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente;

(viii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 de SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente;

(ix) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 de SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q respectivamente;

(x) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 de SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente, los aminoácidos en las posiciones 108-131 se sustituyen por la SEQ ID No: 44, y los aminoácidos en las posiciones 254-258 se sustituyen por la SEQ ID No: 47;

(xi) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 de SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 de SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xiii) la secuencia de la cadena beta de TCR-anti-CD3 de SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son D e I respectivamente y el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xiv) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G.

(xv) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xvi) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A y Q, y en la que el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xvii) y una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 257 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xviii) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 256 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

(xix) una cadena beta de TCR-anti-CD3 que tiene la secuencia SEQ ID No: 36, en la que los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 son A e I respectivamente, y en la que el aminoácido en la posición 255 es una S y el aminoácido en la posición 258 es una G;

- 5 16. Un TCR según la reivindicación 15, en el que
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (vii);
- 10 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (x);
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (ix);
- 15 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (viii);
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (vii);
- 20 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xi);
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xii);
- 25 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (i) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiii);
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiv);
- 30 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xv);
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xvi);
- 40 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xvii);
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xviii);
- 45 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (v) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xix);
la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xi);
- 50 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xii); y
- 55 la secuencia de aminoácidos de la cadena alfa es (vi) y la secuencia de aminoácidos de la cadena beta-anti-CD3 es (xiii).

Figura 1A. Secuencias de aminoácidos de la cadena alfa de TRAV17/TRAJ29/TRAC de TCR específico de gp100 natural, pero con N113 sustituido por K113 (es decir, N4 de la región constante TRAC) (SEQ ID No: 2)

	10	20	30	
	*	*	*	
	SQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINN LQWYRQNS			
40	50	60	70	80
*	*	*	*	*
GRGLVHLILIRSNEREK HSGRLRVTLDT SKKSSS LLITASR				
	90	100	110	120
	*	*	*	*
AADTASYFCATDGD TPLVFGKGTRL SVIANIQKPD PAVYQ				
	130	140	150	160
	*	*	*	*
LRDSKSSDKSVCLFT DFD SQTNVSQSKD SDVYITDKTVLD				
	170	180	190	200
	*	*	*	*
MRSMDFKSNSA VAWSNKSD FACANAFN NSIIPEDTFFPSP				
ESS				

Figura 1B. Secuencia de ADN de la cadena alfa de TCR de referencia (véase la figura 1C) (SEQ ID No: 4) (la cisteína introducida está sombreada)

```

cat atg agt caa caa gga gaa gaa gat cct cag gcc ttg agc
atc cag gag ggt gaa aat gcc acc atg aac tgc agt tac aaa
act agt ata aac aat tta cag tgg tat aga caa aat tca ggt
aga ggc ctt gtc cac cta att tta ata cgt tca aat gaa aga
gag aaa cac agt gga aga tta aga gtc acg ctt gac act tcc
aag aaa agc agt tcc ttg ttg atc acg gct tcc cgg gca gca
gac act gct tct tac ttc tgt gct acg gac gga gac aca cct
ctt gtc ttt gga aag ggc aca aga ctt tct gtg att gca aat
atc cag aag cct gac cct gcc gtg tac cag ctg aga gac tct
aag tcg agt gac aag tct gtc tgc cta ttc acc gat ttt gat
tct caa aca aat gtg tca caa agt aag gat tct gat gtg tat
atc aca gac aaa tgt gtg cta gac atg agg tct atg gac ttc
aag agc aac agt gct gtg gcc tgg agc aac aaa tct gac ttt
gca tgt gca aac gcc ttc aac aac agc att att cca gaa gac
acc ttc ttc ccc agc cca gaa agt tcc taa gct t

```

Figura 1C. Secuencia de aminoácidos de la cadena alfa de TRAV17/TRAJ29/TRAC de TCR específico de gp100 natural - cadena alfa de TCR de referencia, pero con T157 sustituido por cisteína (en negrita y subrayado) (es decir, T48 de la región constante TRAC) (SEQ ID No: 45), y con N113 sustituido por K113.

	10	20	30	
	*	*	*	
	SQQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINN LQWYRQNS			
40	50	60	70	80
*	*	*	*	*
GRGLVHLILIRSNEREKHSGRLRVTLDTSKKSSSLLITASR				
	90	100	110	120
	*	*	*	*
AADTASYFCATDGDTPLVFGKGTRL SVIANIQKPDPAVYQ				
	130	140	150	160
	*	*	*	*
LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDK <u>C</u> VLD				
	170	180	190	200
	*	*	*	*
MRSMDFKSNSA VAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSP				
ESS				

Figura 2A. Secuencia de aminoácidos de la cadena beta de TRBV19*01/TRBD1/
TRBJ2-7*01/TRBC2 de TCR específico de gp100 natural (SEQ ID No: 3)

	10	20	30
	*	*	*
DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC	EQNLNHDAMYWYRQDP		
40	50	60	70
*	*	*	*
GQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVT			
80	90	100	110
*	*	*	*
SAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVF			
120	130	140	150
*	*	*	*
PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV			
160	170	180	190
*	*	*	*
NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF			
200	210	220	230
*	*	*	*
WQNPRNHFR	CQVQFYGLSENDEWTQDRAK	PVTQIVSAEA	
240			
*			
WGRAD			

Figura 2B. Secuencia de ADN natural de la cadena beta de TCR específico de gp100**(SEQ ID No: 5) (la cisteína introducida está sombreada)**

```

cat atg gat ggt gga att act caa tcc cca aag tac ctg ttc
aga aag gaa gga cag aat gtg acc ctg agt tgt gaa cag aat
ttg aac cac gat gcc atg tac tgg tac cgacag gac cca ggg
caa ggg ctg aga ttg atc tac tac tca cag ata gta aat gac
ttt cag aaa gga gat ata gct gaa ggg tac agc gtc tct cgg
gag aag aag gaa tcc ttt cct ctc act gtg aca tcg gcc caa
aag aac ccg aca gct ttc tat ctc tgt gcc agt agt ata ggg
ggc ccc tac gag cag tac ttc ggg ccg ggc acc agg ctc acg
gtc aca gag gac ctg aaa aac gtg ttc cca ccc gag gtc gct
gtg ttt gag cca tca gaa gca gag atc tcc cac acc caa aag
gcc aca ctg gtg tgc ctg gcc acc ggt ttc tac ccc gac cac
gtg gag ctg agc tgg tgg gtg aat ggg aag gag gtg cac agt
ggg gtc tgc aca gac ccg cag ccc ctc aag gag cag ccc gcc
ctc aat gac tcc aga tac gct ctg agc agc cgc ctg agg gtc
tcg gcc acc ttc tgg cag gac ccc cgc aac cac ttc cgc tgt
caa gtc cag ttc tac ggg ctc tcg gag aat gac gag tgg acc
cag gat agg gcc aaa ccc gtc acc cag atc gtc agc gcc gag
gcc tgg ggt aga gca gac taa gct t

```

Figura 2C. Secuencia de aminoácidos de la cadena beta de TRBV19*01/TRBD1/TRBJ2-7*01/TRBC2 de TCR específico de gp100 natural - cadena beta de TCR de referencia, pero con S169 sustituido por cisteína (en negrita y subrayado) (es decir, S57 de la región constante TRBC2), y con C187 sustituido por A187 y N201 sustituido por D201 (SEQ ID No: 46).

	10	20	30
	*	*	*
	DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDP		
40	50	60	70
*	*	*	*
GQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVT			
80	90	100	110
*	*	*	*
SAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVF			
120	130	140	150
*	*	*	*
PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV			
160	170	180	190
*	*	*	*
NGKEVHSGV <u>C</u> TDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATF			
200	210	220	230
*	*	*	*
WQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA			
240			
*			
WGRAD			

FIGURA 3A

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 7)

SQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREK
HSGRLRVTLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATDGSTPLMFGKGTRLSVIA

FIGURA 3B

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 8)

XQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREK
HSGRLRVTLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATDGSTPMQFGKGTRLSVIA
(X = S o A o G)

FIGURA 3C

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena alfa de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 9)

SQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREK
HSGRLRVTLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATDGITPLGFGKDTRLSVIA

Figura 4A

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 10)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCNQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGD
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4B

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 11)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCNQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGD
FQKGDIEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4C

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 12)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCSEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSS**WAQGN**
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4D

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 13)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCSEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSS**WGVGD**
FQKGD**I**EGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4E

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 14)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCSEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSS**WAQGH**
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4F

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 15)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCSEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSS**WAQGN**
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4G

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 16)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCSEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSS**WAYGH**
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4H

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 17)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYY**S**WAVGN
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4I

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 18)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYY**S**QIVNDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCAS**LYCEG**YEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4J

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 19)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYY**S**WAQFDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTVT

Figura 4K

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 20)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYY**S**WGTGD
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4L

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 21)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQN**I**FQKKMYWYRQDPGQGLRLIYY**S**QIVNDFQ
KGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTVT

Figura 4M

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 22)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWGTGD
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGAPYPQYFGPGTRLTV
T

Figura 4N

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 23)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWGTGD
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSHGAPEYEQYFGPGTRLT
VT

Figura 4O

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 24)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWGTGD
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWGAPEYEQYFGPGTRLT
VT

Figura 4P

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 25)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGD
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGAPYPQYFGPGTRLTV
T

Figura 4Q

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 26)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGD
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSHGAPEYEQYFGPGTRLT
VT

Figura 4R

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 27)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSSWAQGD
FQKGDI AEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWGAPYEQYFGPGTRLT
VT

Figura 4S

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 28)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWGAPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4T

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 29)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSYGAPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4U

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 30)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSFGAPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4V

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 31)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSHGAPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4W

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 32)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSSGAPYEQYFGPGTRLTV
T

Figura 4X

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 33)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWITGDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTVT

Figura 4Y

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 34)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWGVGDF
FQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTV
T

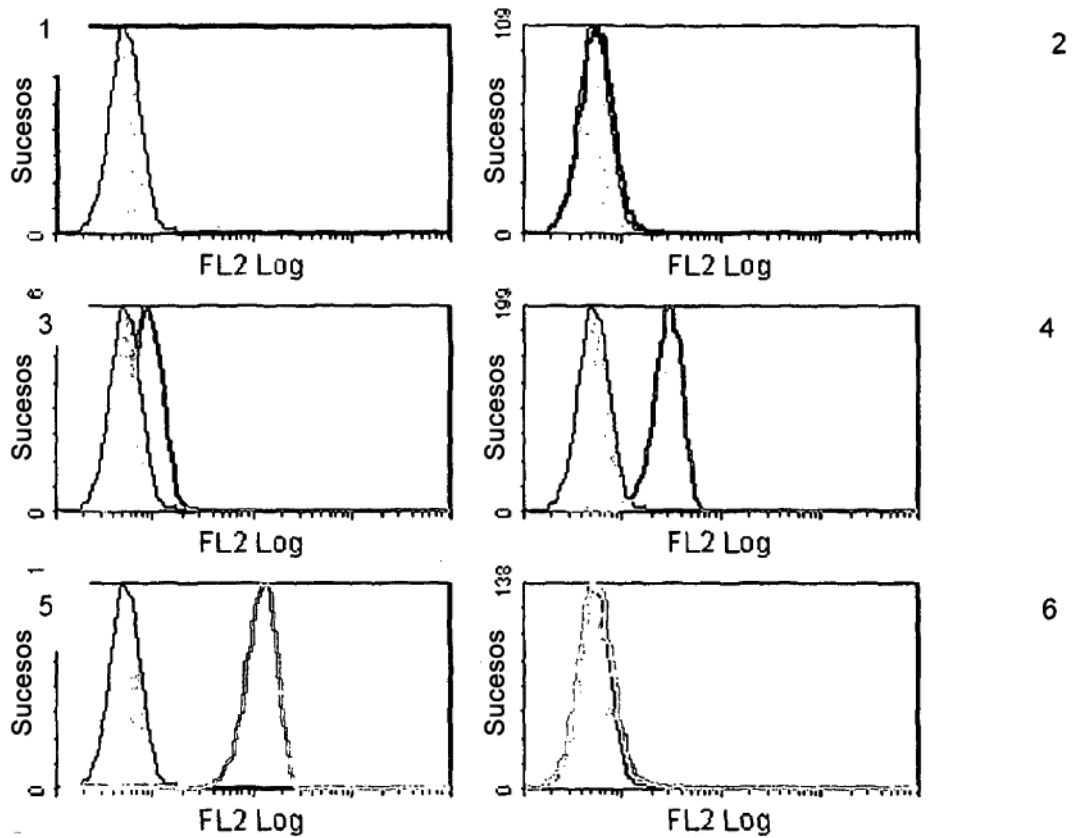
Figura 4Z

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena beta de TCR específico de gp100 de alta afinidad (SEQ ID No: 35)

DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWGTNDF
QKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRLTVT

FIGURA 5A

Tinción de células in vitro usando TCR gp100 de alta afinidad evaluada por citometría de flujo:



- 1) Sin TCR
- 2) variante de péptido gp100 10^{-7} M + TCR irrelevante
- 3) variante de péptido gp100 10^{-9} M + TCR de alta afinidad por gp100
- 4) variante de péptido gp100 10^{-8} M + TCR de alta afinidad por gp100
- 5) variante de péptido gp100 10^{-7} M + TCR de alta afinidad por gp100
- 6) péptido irrelevante 10^{-7} M + TCR de alta afinidad por gp100

FIGURA 5B

Tinción de células in vitro usando TCR gp100 de alta afinidad evaluada por microscopía:

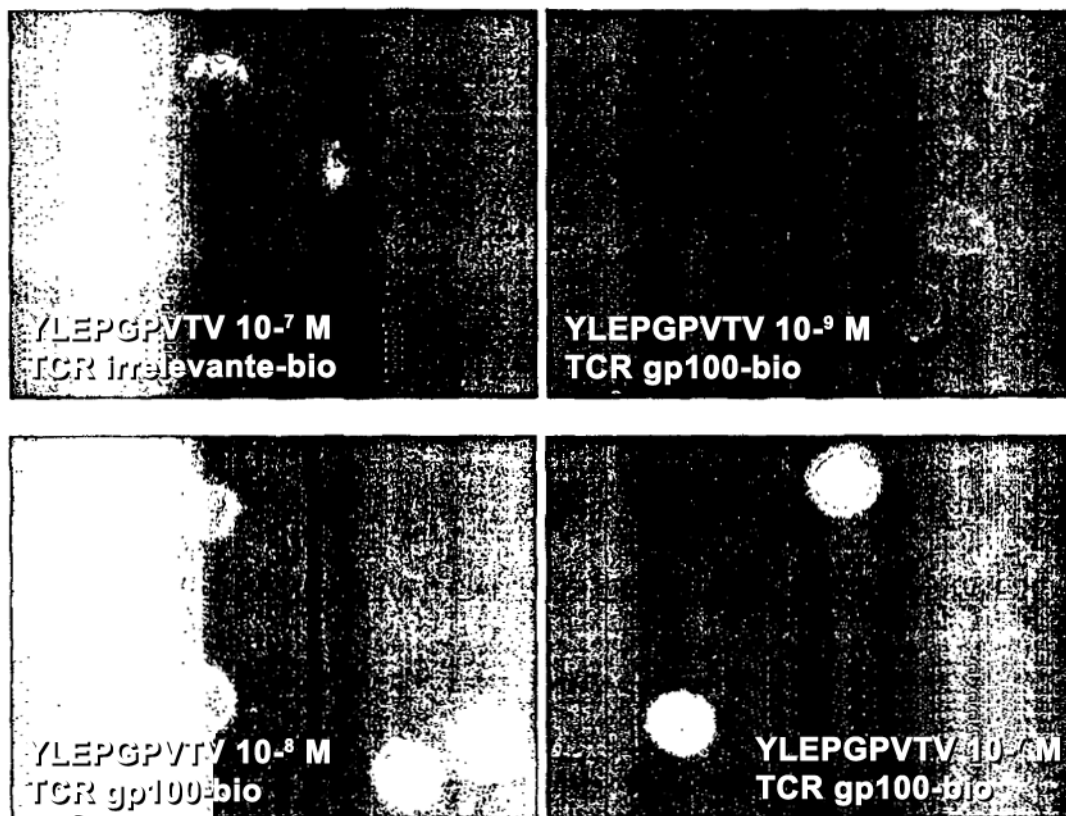


FIGURA 6

SEQ ID No: 36: Secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo scFv dirigido contra CD3 (en negrita) fusionado mediante un conector, en concreto GGGGS (subrayado) en el extremo N de una cadena β de TCR gp100. La cadena β de TCR gp100 contiene la región variable SEQ ID No: 27.

XXQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLES
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGY
TMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSL
RAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTVTVSSGGGGSDGGITQSPKYLFR
KEGQNVTLSCQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSWAQGDFQKGDIAEGYSVS
REKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSWGAPYEYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEV
AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQ
PALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV
SAEAWGRAD

X en la posición 1 = D o A

X en la posición 2 = I o Q

FIGURA 7

Redirección de linfocitos T (dentro de la población de CMSP) por el scFv anti-CD3-TCR de alta afinidad por gp100 de ensayo, para matar la línea celular de melanoma Mel526 (ensayo de citotoxicidad no radiactivo).

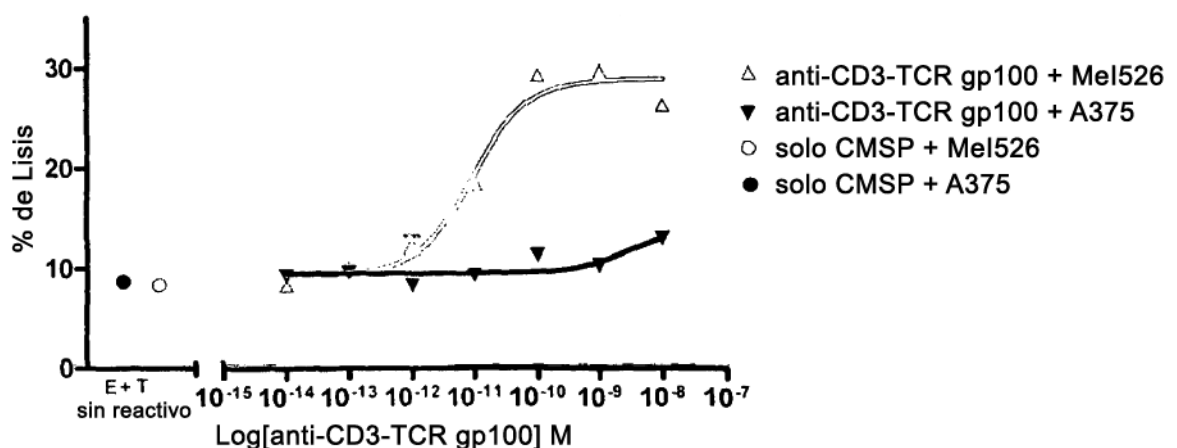


FIGURA 8A

Secuencia de ADN para el TCR específico de gp100 natural, cadena alfa WT-2A-cadena beta WT con la secuencia de tescovirus porcino-1 2A (en negrita y subrayado) (SEQ ID No: 37)

gctagccgccaccatggaaccctgctggcgtagcctggtcatcctgtggctgcagctggccagagtgaattccc
agcagggcggaagaggacccccaggccctcagcatccaggaaggcgagaacgccaccatgaactgcagctaca
agaccagcatcaacaacctgcagtggtagacagaaacagcggcagaggcctggtgcacctgatcctgatcagaa
gcaacgagcgggagaagcacagcggcaggctgagagtgaacctggacaccagcaagaagtcagcagcctgct
gatcaccgccagcagagccgcccagaccgccagctactttgcgccaccgacggcgacacccccctggtgttcggc
aagggcaccagactgagcgtgatcgccaatattcagaagcccgaccccgccgtctaccagctgcgggacagcaa
gagcagcgacaagagcgtgtgctgttcaccgacttcagacagccagaccaacgtgtccagagcaaggacagcg
acgtgtacatcaccgacaagaccgtgtggacatgcggagcatggacttaagagcaacagcggcgtggcctggc
caacaagagcgcacttcgctgcgccaacgcctcaacaacagcatcatccccgaggacaccttttccccagccccg
agagcagctgcgacgtcaaactggtggagaagtcttcgagacagacaccaacctgaactccagaacctctccgt
gatcggcttcagaatcctgctgctgaaggtggccggttcaacctgctgatgacctgcggctgtggagcagcggcag
ccgggccaagagaagcggatccggcgccaccaacttctccctgctgaagcagggccggcgcacgtggaggaa
aacctggcccttaggatgagcaaccagggtgctctgctgcgtggtgctgtttcctgggggccaacaccgtggacgg
cgcatcaccagagccccaagtacgttccggaaagaggccagaacgtcacctgagctgcgagcagaacct
caaccagacgccatgtactggtacaggcaggaccaggacaaggcctccggctgatctactacagccagatcgt
gaacgacttcagaagggcgatattgccgagggctacagcgtgtccgggagaagaaagagagcttccccctgac
cgtcaccagcggccagaagaacccccaccgccttctacctgtgcgccagcagcatcggcggaccctacgagcagta
cttcggccctggcaccggctgacagtgaactgaggacctgaagaacgtgttccccccgaggtggcgtgttcgagc
ccagcagggccgagatcagccacaccagaaagccaccctggtctgcctggccaccggctttaccccgaccacgt
ggagctgtcttgggtgggtgaacggcaaagaggtgcacagcggcgtcagcaccgacccccagcctctcaaagagca
gcccgcctgaacgacagccggtactgcctcagctctcggtgcgggtgtccgccaccttctggcagaacccccgga
accacttcgggtgccaggtgcagttctacggcctgagcgagaacgacgagtgactcaggatagagccaagccgt
gaccagatcgtgtccgagggcctggggcgccgaltgcggcttaccagcgagagctatcagcagggcgt
gctgtctgccaccatcctgtacgagatcctgtgggcaaggccaccctgtacgcggtgctcgtgtcctggtgtga
tggctatggtcaagcggaaggacagccggggctaagtcgac

FIGURA 8B

Secuencia de aminoácidos de TCR específico de gp100 natural, cadena alfa WT-2A-
cadena beta WT con la secuencia de tescovirus porcino-1 2A (en negrita y subrayado)
(SEQ ID No: 38)

10	20	30	40
*	*	*	*
METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENAT			
50	60	70	80
*	*	*	*
MNC SYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR			
90	100	110	120
*	*	*	*
LRVTLDTSKKSSSLLITASRAADTASYFCATDGDTPLVFGK			
130	140	150	160
*	*	*	*
GTRL SVIANIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT			
170	180	190	200
*	*	*	*
NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDF			
210	220	230	240
*	*	*	*
ACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLNF			
250	260	270	280
*	*	*	*
QNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSGSRKRSGSGA			
290	300	310	320
*	*	*	*
<u>TNFSLLKQAGDVEENPGPR</u> MSNQVLCCVVLCLGANTVD			
330	340	350	
*	*	*	
GGITQSPKYLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQDPG			

360	370	380	390	400
*	*	*	*	*
QGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSA				
	410	420	430	440
	*	*	*	*
QKNPTAFYLCASSIGGPYEQYFGPGTRTLVTEDLKNVFPP				
	450	460	470	480
	*	*	*	*
EVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNG				
	490	500	510	
	*	*	*	
KEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ				
520	530	540	550	
*	*	*	*	
NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG				
560	570	580	590	
*	*	*	*	
RADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVL				
600	610			
*	*			
MAMVKRKDSRG				

FIGURA 9

Activación aumentada de linfocitos T transducidos con TCR de afinidad mejorada por gp100 comparado con linfocitos T transducidos con TCR de afinidad natural en respuesta a líneas de células tumorales

Fig 9a

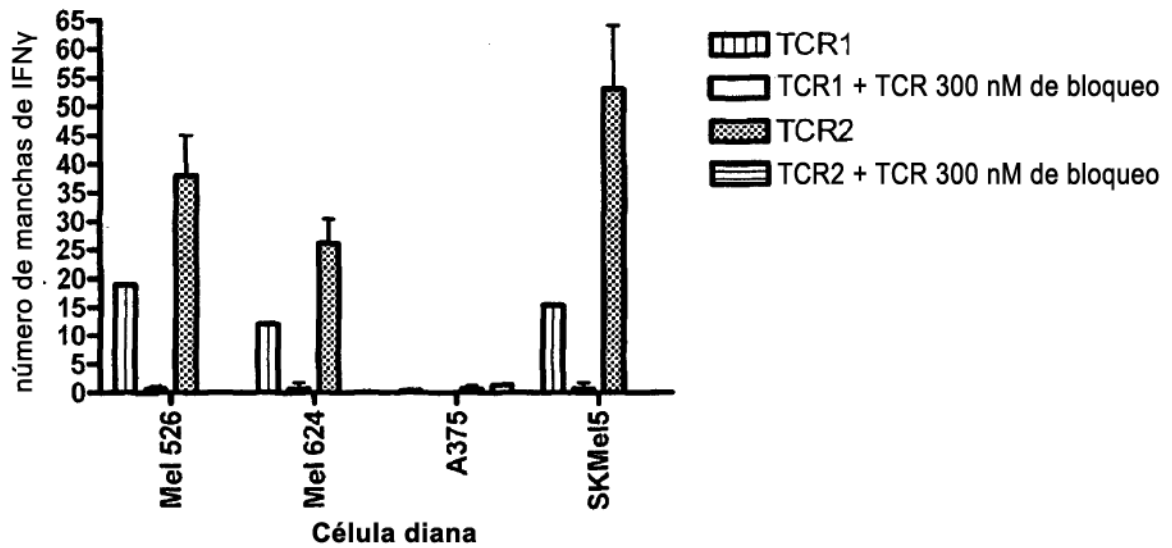


Fig 9b

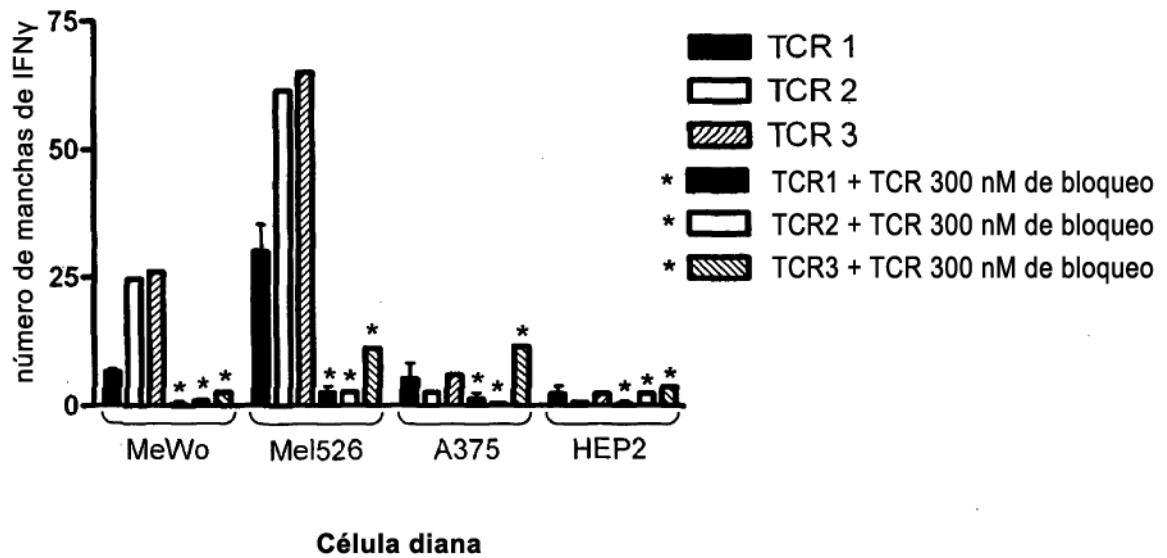


FIGURA 10

Activación de linfocitos T CD8+ por fusiones TCR gp100-scFv anti-CD3 que tienen diferentes afinidades por TCR-pMHC.

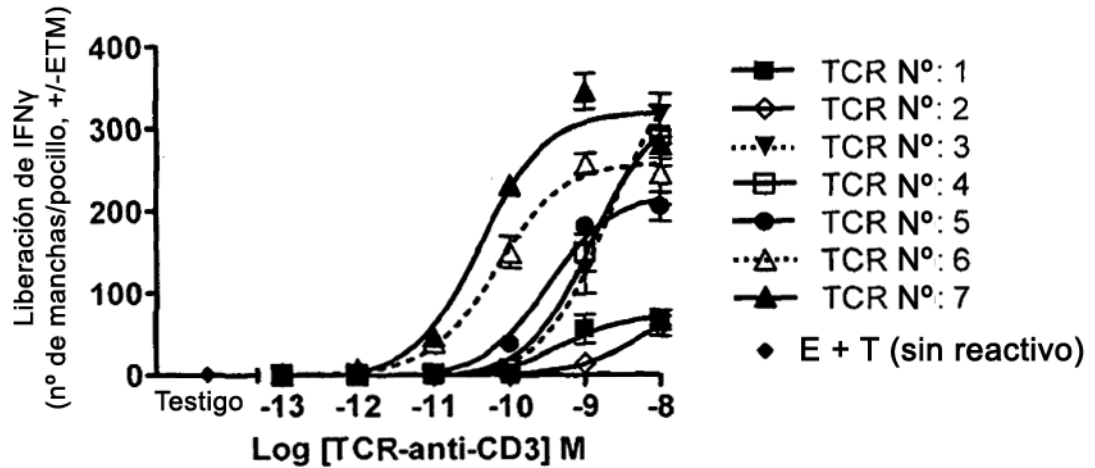


FIGURA 11

Ensayo de redirección de linfocitos T que ensaya la potencia de fusiones TCR gp100-anti-CD3 de alta afinidad.

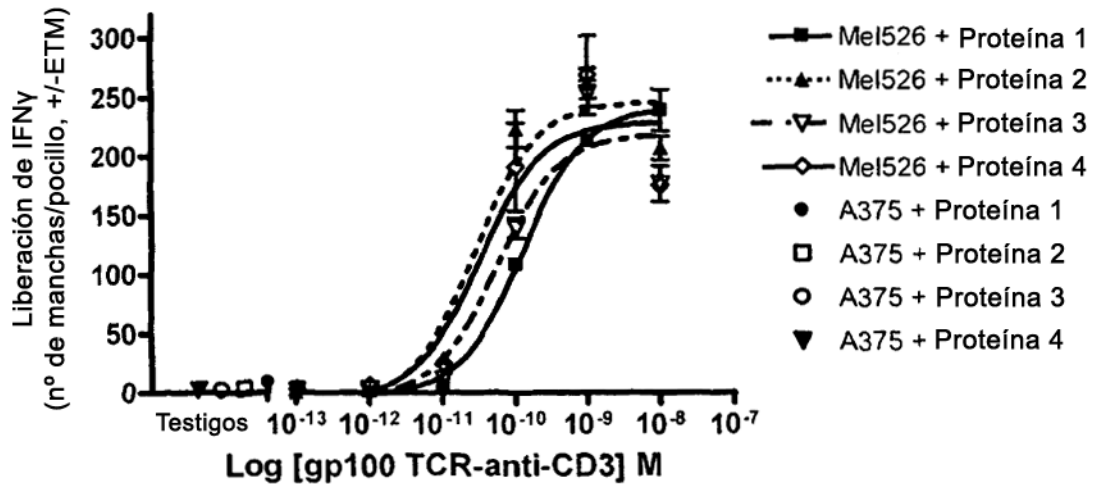


FIGURA 12

