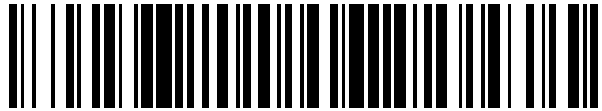


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 465**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/725** (2006.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2003 E 03753742 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 1549748**

54 Título: **Receptores de linfocitos T recombinados de una sola cadena**

30 Prioridad:

**09.10.2002 GB 0223399**  
**05.02.2003 GB 0302604**  
**22.02.2003 GB 0304064**  
**05.06.2003 US 475784 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.12.2014**

73 Titular/es:

**IMMUNOCORE LTD. (50.0%)**  
**91 Park Drive, Milton Park**  
**Abingdon OX14 4RY, GB y**  
**ADAPTImmune Limited (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JAKOBSEN, BENT KARSTEN y**  
**GLICK, MEIR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 525 465 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 recombinados de una sola cadena

5 La presente invención se refiere a receptores de linfocitos T (TCR) de una sola cadena.

Antecedentes de la invención

TCR nativos

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

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

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

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

30 La porción extracelular de los  $\alpha\beta$ TCR heterodiméricos nativos consiste en dos polipéptidos, cada uno de los cuales tiene un dominio constante proximal a la membrana y un dominio variable distal a la membrana (véase Figura 1). Cada uno de los dominios constantes y variables contiene un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios variables contienen los bucles altamente polimórficos análogos a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos. CDR3 de los TCR interactúa con el péptido presentado por el MHC, y los CDR 1 y 2 interactúan con el péptido y el MHC. La diversidad de secuencias de los TCR se genera a través del reordenamiento somático de los genes ligados variable (V), diversidad (D), unión (J) y constante. Los polipéptidos de cadena  $\alpha$  funcionales están formados por regiones V-J-C, reordenadas, mientras que las cadenas  $\beta$  constan de regiones V-D-J-C. El dominio constante extracelular tiene una región proximal a la membrana y una región de inmunoglobulina. Existe un único dominio constante de cadena  $\alpha$ , conocido como TRAC, y dos dominios constantes  $\beta$  diferentes, conocidos como TRBC1 y TRBC2 (nomenclatura IMGT). Existen cuatro cambios de aminoácidos entre estos dominios constantes  $\beta$ , tres de los cuales están dentro de los dominios utilizados para producir los TCR de una sola cadena de la presente invención. Estos cambios están todos dentro del exón 1 de TRBC1 y TRBC2:  $N_4K_5 \rightarrow K_4N_5$  y  $F_{37} \rightarrow Y$  (numeración IMGT, diferencias TRBC1  $\rightarrow$  TRBC2), con el cambio de aminoácido final entre las dos regiones constantes de la cadena  $\beta$  de TCR en el exón 3 de TRBC1 y TRBC2:  $V_1 \rightarrow E$ . La extensión de cada uno de los dominios extracelulares de TCR es algo variable. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar fácilmente la posición de los límites del dominio utilizando una referencia como *The T Cell Receptor Facts Book*, Lefranc & Lefranc, Publ. Academic Press 2001.

TCR de una sola cadena

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

inestabilidad natural del apareamiento del dominio soluble alfa-beta.

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

Chung et al (1994) PNAS. 91 (26) 12654-8 Informan de la producción de un scTCR humano utilizando un diseño V $\alpha$ -conector-V $\beta$ -C $\beta$  y expresión en la superficie de una línea celular de mamífero. Este informe no incluye ninguna referencia a la unión específica HLA-péptido del scTCR. Plaksin et al (1997) J. Immunol. 158 (5): 2218-27 informan de un diseño V $\alpha$ -conector-V $\beta$ -C $\beta$  similar para producir un scTCR múrido específico para un epítoto gp 120-H-2D<sup>d</sup> de VIH. Este scTCR se expresa como cuerpos de inclusión bacterianos y se repliega in vitro. WO 99/18129 da a conocer un constructo de scTCR fusionado a una región constante de cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de éste.

#### Uso terapéutico

Existe la necesidad de grupos para administración dirigida capaces de localizarse en células afectadas por procesos patológicos. Dichos grupos para administración dirigida se podrían utilizar para bloquear directamente la acción 'dirigida erróneamente' del sistema inmunitario responsable de la enfermedad autoinmunitaria o como una forma de administrar citotóxicos a células cancerosas.

Idealmente, las moléculas adecuadas para estas aplicaciones requieren una afinidad especial por un marcador celular involucrado directamente en el proceso patológico pertinente. Los anticuerpos han sido utilizados para este fin.

#### Uso en cribado

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

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

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

#### Breve descripción de la invención

Esta invención pone a disposición una nueva clase de scTCR análogos a los alfa/beta que se caracterizan por la presencia de un enlace disulfuro entre los residuos de la única hebra de aminoácidos, donde ese enlace contribuye a la estabilidad del apareamiento entre las regiones alfa y beta de la molécula. Dichos TCR son útiles para cribado o fines terapéuticos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un receptor de linfocitos T de una sola cadena (scTCR) que contiene un segmento  $\alpha$  constituido por una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia extracelular de la región constante de la cadena  $\alpha$  del TCR, un segmento  $\beta$  constituido por una secuencia de la región variable de la cadena  $\beta$  del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia extracelular de la región constante de la cadena  $\beta$  del TCR, y una secuencia conectora que une el extremo C terminal del segmento  $\alpha$  con el extremo N terminal del segmento  $\beta$ , o vice versa, donde las secuencias extracelulares de las regiones constantes de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  están unidas por un enlace disulfuro entre los

residuos de cisteína sustituidos en

Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o

Thr 45 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 77 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o

Tyr 10 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 17 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o

Thr 45 del exón 1 de TRAC\*01 y Asp 59 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o

Ser 15 del exón 1 de TRAC\*01 y Glu 15 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01;

siendo la longitud de la secuencia conectora y la posición del enlace disulfuro tales que las secuencias de las regiones variables de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  están mutuamente orientadas esencialmente como en los receptores de linfocitos T  $\alpha\beta$  nativos.

En los scTCR de la invención el requisito de que las secuencias de las regiones variables de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  estén mutuamente orientadas esencialmente como en los receptores de los linfocitos T  $\alpha\beta$  nativos se prueba confirmando que la molécula se une al ligando de TCR correspondiente (complejo pMHC, complejo CD1-antígeno; superantígeno o complejo superantígeno/pMHC) - si se une, entonces se cumple el requisito. Las interacciones con complejos pMHC se pueden medir utilizando un instrumento BIAcore 3000™ o BIAcore 2000™. El ejemplo 3 de este documento o WO99/6120 respectivamente, proporcionan descripciones detalladas de los métodos necesarios para analizar la unión de TCR a complejos péptido-MHC. Estos métodos son igualmente aplicables al estudio de las interacciones TCR/CD1 y TCR/superantígeno. Para aplicar estos métodos al estudio de las interacciones TCR/CD1 se requieren formas solubles de CD1, cuya producción se describe en (Bauer (1997) Eur J Immunol 27 (6) 1366-1373).

Segmentos  $\alpha$  y  $\beta$ 

Las secuencias extracelulares de las regiones constantes presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden preferentemente a las de un TCR humano, como lo hacen las secuencias de las regiones variables presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, la correspondencia entre dichas secuencias no necesita ser 1:1 a nivel de aminoácidos. Es aceptable el truncamiento N- o C-terminal, y/o la eliminación y/o la sustitución de aminoácidos con respecto a las secuencias correspondientes del TCR humano, siempre que el resultado general sea la orientación mutua de las secuencias de las regiones variables de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  como en los receptores de linfocitos T  $\alpha\beta$  nativos y el mantenimiento de la funcionalidad de unión al péptido-MHC. En particular, debido a que las secuencias extracelulares de las regiones constantes presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  no están directamente involucradas en los contactos con el complejo péptido-MHC al cual se une el scTCR, pueden ser más cortas que, o pueden contener sustituciones o deleciones respecto a, las secuencias extracelulares del dominio constante de los TCR nativos.

La secuencia extracelular de la región constante presente en el segmento  $\alpha$  puede incluir una secuencia correspondiente al dominio extracelular constante Ig de una cadena  $\alpha$  del TCR, y/o la secuencia extracelular de la región constante presente en el segmento  $\beta$  puede incluir una secuencia correspondiente al dominio extracelular constante Ig de una cadena  $\beta$  del TCR.

En una realización de la invención, el segmento  $\alpha$  corresponde a esencialmente toda la región variable de una cadena  $\alpha$  del TCR fusionada al extremo N terminal de esencialmente todo el dominio extracelular de la región constante de una cadena  $\alpha$  del TCR; y/o el segmento  $\beta$  corresponde a esencialmente toda la región variable de una cadena  $\beta$  del TCR fusionada al extremo N terminal de esencialmente todo el dominio extracelular de la región constante de una cadena  $\beta$  del TCR.

En otra realización, las secuencias extracelulares de las regiones constantes presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden a las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un TCR nativo truncadas en sus extremos C terminales de modo que los residuos de cisteína que forman el enlace disulfuro intercatenario nativo del TCR sean excluidos. Alternativamente, esos residuos de cisteína pueden ser sustituidos por otro residuo de aminoácido como serina o alanina, de modo que el enlace disulfuro nativo sea eliminado. Además, la cadena  $\beta$  del TCR nativo contiene un residuo de cisteína sin aparear y ese residuo puede ser eliminado de, o reemplazado por un residuo que no sea una cisteína en, la secuencia  $\beta$  del scTCR de la invención.

En una realización particular de la invención, las secuencias de las regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR

5 presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  pueden conjuntamente corresponder al dominio variable funcional de un primer TCR, y las secuencias extracelulares de las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  pueden corresponder a las de un segundo TCR, donde el primer y el segundo TCR son de la misma especie. Por lo tanto, las secuencias de las regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  pueden corresponder a las de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares de las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  pueden corresponder a las de un segundo TCR humano. Por ejemplo, las secuencias extracelulares de la región constante del sTCR A6 Tax se pueden usar como marco sobre el cual se pueden fusionar los dominios variables heterólogos.

10 En otra realización de la invención las secuencias de las regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden conjuntamente al dominio variable funcional de un primer TCR, y las secuencias extracelulares de las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden a las de un segundo TCR, donde el primer y el segundo TCR son de especies diferentes. En esta  
 15 realización se prefiere que las secuencias de las regiones variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  correspondan conjuntamente al dominio variable funcional de un primer TCR humano, y las secuencias extracelulares de las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  correspondan a las de un TCR de ratón. Dichas realizaciones de la presente invención tienen la ventaja de que los sTCR contienen secuencias de regiones constantes no humanas que es probable que sean inmunógenas, y por lo tanto es probable que potencien la respuesta inmunitaria general al dTCR cuando se localicen en su célula diana. La  
 20 respuesta inmunitaria a células aberrantes como las células cancerosas puede así ser potenciada.

Conector

25 En la presente invención, una secuencia conectora une los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$ , para formar una única hebra polipeptídica. La secuencia conectora puede tener, por ejemplo, la fórmula -P-AA-P- en la que P es prolina y AA representa una secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos son glicina y serina.

30 Para que el sTCR se una a un complejo péptido-MHC, los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  deben estar apareados de modo que las secuencias de las regiones variables de éstos estén orientadas para dicha unión. Por lo tanto el conector debe tener una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C terminal del segmento  $\alpha$  y el extremo N terminal del segmento  $\beta$ , o vice versa. Por otra parte se debe evitar una longitud excesiva del conector, en caso de que el extremo del conector en la secuencia de la región variable N-terminal bloquee o reduzca la unión del sTCR al complejo péptido-MHC diana.

35 Por ejemplo, en el caso en el que las secuencias extracelulares de las regiones constantes presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden a las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un TCR nativo truncadas en sus extremos C terminales de modo que los residuos de cisteína que forman el enlace disulfuro intercatenario nativo del TCR son excluidos, y que la secuencia del conector une el extremo C terminal del segmento  $\alpha$  al extremo N terminal del segmento  $\beta$ , el conector puede constar de 26 a 41, por ejemplo de 29, 30, 31 o 32 aminoácidos, y un conector  
 40 particular tiene la fórmula -PGGG-(SGGGG)<sub>5</sub>-P- en la que P es prolina, G es glicina y S es serina.

Enlace disulfuro

45 Un elemento caracterizante principal de los sTCR de la presente invención es el enlace disulfuro entre los residuos de cisteína sustituidos para ciertos aminoácidos en las secuencias extracelulares de las regiones constantes de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$ . En algunos casos, puede ser deseable tanto un enlace disulfuro nativo como no nativo en los sTCR de la presente.

50 La posición del enlace disulfuro está sujeta al requisito de que las secuencias de las regiones variables de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  estén mutuamente orientadas esencialmente como en los receptores de linfocitos T  $\alpha\beta$  nativos.

El enlace disulfuro se forma mutando residuos que no son de cisteína en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  a cisteína, y provocando la formación del enlace entre los residuos mutados. Se eligen los residuos cuyos respectivos carbonos  $\beta$  están separados aproximadamente 6 Å (0.6 nm) o menos, y preferentemente en el rango de 3.5 Å (0.35 nm) a 5.9 Å (0.59 nm) en el TCR nativo, de modo que se pueda formar un enlace disulfuro entre residuos de cisteína  
 55 introducidos en el lugar de los residuos nativos. Los sitios en los que se introducen las cisteínas para formar un enlace disulfuro son los residuos siguientes en el exón 1 de TRAC\*01 para la cadena  $\alpha$  del TCR y TRBC1\*01 o TRBC2\*01 para la cadena  $\beta$  del TCR:

Cadena $\alpha$ del TCR	Cadena $\beta$ del TCR	Separación nativa de los carbonos $\beta$ (nm)
Thr 48	Ser 57	0.473
Thr 45	Ser 77	0.533

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

5 Ahora que se han identificado los residuos de los TCR humanos que pueden ser mutados a residuos de cisteína para formar un nuevo enlace disulfuro intercatenario en los scTCR según la invención, los expertos en el área serán capaces de mutar de la misma manera los TCR de otra especie para producir un scTCR de esa especie. En los humanos, los expertos sólo necesitan buscar los motivos siguientes en las cadenas de TCR respectivas para identificar el residuo a mutar (el residuo sombreado es el residuo para la mutación a cisteína).

Cadena $\alpha$ , Thr 48:	DSDVYITDKTVLDMRSMDFK (aminoácidos 39-58 del exón 1 del gen TRAC*01)
Cadena $\alpha$ , Thr 45:	QSKDSDVYITDKTVLDMRSM (aminoácidos 36-55 del exón 1 del gen TRAC*01)
Cadena $\alpha$ , Tyr 10:	DIQNPDPAVYQLRDSKSSDK (aminoácidos 1-20 del exón 1 del gen TRAC*01)
Cadena $\alpha$ , Ser 15:	DPAVYQLRDSKSSDKSVCLF (aminoácidos 6-25 del exón 1 del gen TRAC*01)
Cadena $\beta$ , Ser 57:	NGKEVHSGVSTDPQPLKEQP (aminoácidos 48-67 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01)
Cadena $\beta$ , Ser 77:	ALNDSRYALSSRLRVSATFW (aminoácidos 68-87 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01)
Cadena $\beta$ , Ser 17:	PPEVAVFEPSEAEISHTQKA (aminoácidos 8-27 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01)
Cadena $\beta$ , Asp 59:	KEVHSGVSTDPQPLKEQPAL (aminoácidos 50-69 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01)
Cadena $\beta$ , Glu 15:	VFPPEVAVFEPSEAEISHTQ (aminoácidos 6-25 del exón 1 de los genes TRBC1*01 y TRBC2*01)

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

15 La presente invención incluye dentro de su alcance scTCR análogos a los  $\alpha\beta$ , así como los de otros mamíferos, incluidos, pero no exclusivamente, de ratón, rata, cerdo, cabra y oveja. También están comprendidos los scTCR quiméricos humanos/no humanos como se trató antes. Como se mencionó antes, los expertos en el área serán capaces de determinar sitios equivalentes a los sitios humanos descritos precedentemente en los cuales se pueden introducir residuos de cisteína para formar un enlace disulfuro intercatenario. Por ejemplo, a continuación se muestran las secuencias de aminoácidos de los dominios solubles C $\alpha$  y C $\beta$  del ratón, junto con motivos que muestran los residuos múridos equivalentes a los residuos humanos mencionados antes que se pueden mutar a cisteínas para formar un enlace disulfuro intercatenario de TCR (donde los residuos correspondientes están sombreados):

25 Dominio soluble C $\alpha$  de ratón:

**PYIQNPEPAVYQLKDPQSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMK**  
**AMDSKSNAGALAWSNQTSTFTCQDIFKETNATYPSSDVP**

30 Dominio soluble C $\beta$  de ratón:

**EDLRNVTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGREV**  
**HSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNP RNHFRCQVQFHGLSEEDK**  
**WPEGSPKPVQTQNISAEAWGRAD**

Equivalente múrido de Thr 48 de la cadena  $\alpha$  humana: ESGTFITDKTVLDMKAMDSK

Equivalente múrido de Thr 45 de la cadena  $\alpha$  humana: KTMESGTFITDKTVLDMKAM

Equivalente múrido de Tyr 10 de la cadena  $\alpha$  humana: YIQNPEPAVYQLKDPRSQDS

Equivalente múrido de Ser 15 de la cadena  $\alpha$  humana: AVYQLKDPRSQDSTLCLFTD

Equivalente múrido de Ser 57 de la cadena  $\beta$  humana: NGREVHSGVSTDPQAYKESN

Equivalente múrido de Ser 77 de la cadena  $\beta$  humana: KESNYSYCLSSRLRVSATFW

Equivalente múrido de Ser 17 de la cadena  $\beta$  humana: PPKVSLFEPSKAEIANKQKA

Equivalente múrido de Asp 59 de la cadena  $\beta$  humana: REVHSGVSTDPQAYKESNYS

Equivalente múrido de Glu 15 de la cadena  $\beta$  humana: VTPPKVSLFEPSKAEIANKQ

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

#### Aspectos adicionales

Un scTCR (que sea preferentemente humano) de la presente invención se puede proporcionar en forma esencialmente pura, o como una preparación purificada o aislada. Por ejemplo, se puede proporcionar en una forma que esté esencialmente exenta de otras proteínas.

Varios scTCR de la presente invención se pueden proporcionar en un complejo multivalente. Por lo tanto, la presente invención proporciona, en un aspecto, un complejo multivalente de receptores de linfocitos T (TCR), que comprende varios receptores de linfocitos T solubles como se describe en este documento. Cada uno de esos varios TCR solubles es preferentemente idéntico a los otros.

En el complejo multivalente de la presente invención, el scTCR puede estar en forma de multímeros, y/o puede estar presente en, o asociado a, una bicapa lipídica, por ejemplo, un liposoma.

En su forma más simple, un complejo multivalente de scTCR de conformidad con la invención comprende un multímero de dos, tres o cuatro moléculas de receptores de linfocitos T asociadas (por ejemplo, covalentemente o unidas de otra manera) entre sí, preferentemente a través de una molécula conectora. Las moléculas conectoras adecuadas incluyen, pero no exclusivamente, moléculas de unión multivalentes como avidina, estreptavidina, neutravidina y extravidina, cada una de las cuales tiene cuatro sitios de unión para la biotina. Por consiguiente, las moléculas de TCR biotiniladas se pueden ensamblar como multímeros de receptores de linfocitos T con varios sitios de unión al TCR. La cantidad de moléculas de TCR en el multímero dependerá de la cantidad de TCR en relación con la cantidad de molécula conectora utilizada para preparar los multímeros, y también de la presencia o ausencia de cualquier otra molécula biotinilada. Los multímeros preferidos son complejos de TCR diméricos, triméricos o tetraméricos.

Las estructuras que son bastante más grandes que los tetrámeros de TCR se pueden usar para seguir o señalar células que expresan un complejo péptido-MHC específico. Preferentemente las estructuras están en el rango de 10 nm a 10  $\mu$ m de diámetro. Cada estructura puede presentar múltiples moléculas de scTCR suficientemente separadas para permitir que dos o más moléculas de TCR de la estructura se unan simultáneamente a dos o más complejos péptido-MHC en una célula y de ese modo aumentar la avididad del grupo de unión del multímero por la célula.

Las estructuras adecuadas para usar en la invención, para formar complejos con uno o varios scTCR, incluyen estructuras de membrana como liposomas y estructuras sólidas que son preferentemente partículas como perlas, por ejemplo perlas de látex. Otras estructuras que pueden ser recubiertas externamente con moléculas de receptor de linfocitos T también son adecuadas. Preferentemente, las estructuras se recubren con multímeros de receptores

de linfocitos T en vez de con moléculas individuales de receptor de linfocitos T.

En el caso de los liposomas, las moléculas de receptor de linfocitos T o sus multímeros se pueden unir o asociar de otra manera a la membrana. Los expertos conocen técnicas para lograr esto.

Se puede incluir un marcador u otro grupo, como un grupo tóxico o terapéutico, en un complejo multivalente de scTCR de la presente invención. Por ejemplo, el marcador u otro grupo puede ser incluido en una molécula de multímero mixta. Un ejemplo de dicha molécula multimérica es un tetrámero que contiene tres moléculas de scTCR y una molécula de peroxidasa. Esto se podría lograr mezclando el TCR y la enzima en una relación molar de 3:1 para generar complejos tetraméricos, y aislar el complejo deseado de cualquier otro complejo que no contenga la relación correcta entre moléculas. Estas moléculas mixtas podrían contener cualquier combinación de moléculas, siempre que el impedimento estérico no comprometa o no comprometa significativamente la función deseada de las moléculas. La posición de los sitios de unión en la molécula de estreptavidina es adecuada para tetrámeros mixtos porque no es probable que se produzca impedimento estérico.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar complejos péptido-MHC, que comprende:

- a. proporcionar un scTCR de la invención actual
- b. poner en contacto el scTCR con los complejos péptido-MHC; y detectar la unión del scTCR con los complejos péptido-MHC.

#### Uso terapéutico

Un scTCR (o complejo multivalente de éste) de la presente invención se puede asociar alternativa o adicionalmente (por ej. covalentemente o unido de otra manera) a un agente terapéutico que puede ser, por ejemplo, un grupo tóxico para usar en muerte celular, o un agente inmunoestimulante como una interleucina o una citocina. Un complejo multivalente de scTCR de la presente invención puede tener una capacidad de unión superior a un ligando del TCR como un complejo pMHC o una molécula de CD1 en comparación con un heterodímero de receptor de linfocitos T no multimérico. Por lo tanto, los complejos multivalentes de scTCR de conformidad con la invención son particularmente útiles para seguir o señalar células que presentan antígenos particulares in vitro o in vivo y también son útiles como productos intermedios para la producción de otros complejos multivalentes de TCR que tengan ese tipo de usos. El scTCR o complejo multivalente de TCR, puede ser por lo tanto proporcionado en una formulación farmacéuticamente aceptable para usar in vivo.

En este documento se da a conocer un método para administrar un agente terapéutico a una célula diana, donde dicho método comprende poner en contacto las células diana potenciales con un scTCR o un complejo multivalente de scTCR de conformidad con la invención en condiciones que permitan la unión del scTCR o del complejo multivalente de scTCR con la célula diana, donde dicho scTCR o complejo multivalente de scTCR es específico para los complejos péptido-MHC y tiene un agente terapéutico asociado.

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

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

Otros agentes terapéuticos adecuados incluyen:

- moléculas pequeñas citotóxicas, es decir, compuestos con la capacidad para matar células de mamíferos con un peso molecular menor de 700 Dalton. Dichos compuestos también podrían contener metales tóxicos capaces de tener un efecto citotóxico. Además, se debe entender que estas moléculas pequeñas citotóxicas de también incluyen los profármacos, es decir, compuestos que se descomponen o se convierten en condiciones fisiológicas para liberar agentes citotóxicos. Los ejemplos de tales agentes incluyen cisplatino, derivados de maitansina, raquelmicina, caliqueamicina, docetaxel, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecán, melfalán, mitoxantrona, porfímero sódico photofrin II, temozolmida, topotecán, glucuronato de trimetreato, auristatina E, vincristina y doxorubicina;



- citotoxinas peptídicas, es decir proteínas o sus fragmentos con capacidad para matar células de mamíferos. Los ejemplos incluyen ricina, toxina diftérica, exotoxina A de la bacteria *Pseudomonas*, ADNasa y ARNasa;
- radionúclidos, es decir, isótopos inestables de elementos que se desintegran con la emisión simultánea de una o más de las partículas  $\alpha$  o  $\beta$ , o rayos  $\gamma$ . Los ejemplos incluyen yodo 131, renio 186, indio 111, itrio 90, bismuto 210 y 213, actinio 225 y astato 213;
- profármacos, como profármacos enzimáticos dirigidos por anticuerpos;
- inmunoestimulantes, es decir, grupos que estimulan la respuesta inmunitaria. Los ejemplos incluyen citocinas como IL-2, quimiocinas como IL-8, factor plaquetario 4, proteína estimulante del crecimiento del melanoma, etc., los anticuerpos o fragmentos de éstos, activadores de complemento, dominios de proteínas xenogénicas, dominios de proteínas alogénicas, dominios de proteínas virales/bacterianas y péptidos virales/bacterianos.

Los scTCR solubles o complejos multivalentes de scTCR de la invención se pueden unir a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco. Esto permite que el profármaco se convierta en el fármaco sólo en el sitio donde es necesario (es decir, dirigido por el scTCR).

Los ejemplos de dianas péptido-MHC adecuados para el scTCR de conformidad con la invención incluyen, pero no exclusivamente, epítipo virales como los epítipos de HTLV-1 (por ej. el péptido Tax restringido por HLA-A2; HTLV-1 se asocia a leucemia), los epítipos del VIH, los epítipos del EBV, los epítipos del CMV; los epítipos del melanoma (por ej. el epítipo MAGE-1 restringido por HLA-A1) y otros epítipos específicos del cáncer (por ej. el antígeno G250 asociado al carcinoma de células renales restringido por HLA-A2); y epítipos asociados a trastornos autoinmunitarios, como la artritis reumatoide. Otros pMHC diana asociados a enfermedades, adecuados para utilizar en la presente invención, se indican en HLA Factbook (Barclay (Ed) Academic Press), y muchos otros están siendo identificados.

Localizar la administración de fármacos a través de la especificidad de los scTCR puede potencialmente mejorar una multitud de tratamientos de enfermedades.

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

Los scTCR de la presente invención se pueden utilizar para modular la activación de los linfocitos T uniéndose a los ligandos específicos como pMHC e inhibiendo así la activación de los linfocitos T. Las enfermedades autoinmunitarias que implican inflamación y/o daño tisular mediados por linfocitos T podrían avenirse a este enfoque, por ejemplo la diabetes tipo I. El conocimiento del epítipo peptídico específico presentado por el pMHC correspondiente es necesario para este uso.

Los medicamentos de conformidad con la invención se suministrarán generalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada, (dependiendo del método deseado de administrarla a un paciente). Se puede suministrar como una forma farmacéutica unitaria, generalmente se proporcionará en un envase sellado y se puede proporcionar como parte de un conjunto. Dicho conjunto incluirá normalmente (aunque no necesariamente) indicaciones de uso. Puede incluir varias de dichas formas farmacéuticas unitarias.

La composición farmacéutica puede ser adaptada para la administración por cualquier vía adecuada, por ejemplo la vía oral (incluidas bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluidas bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluidas subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichos composiciones se pueden preparar por cualquier método conocido en el área de la farmacia, por ejemplo mezclando el principio activo con el portador o portadores o el excipiente o excipientes en condiciones estériles.

#### Uso en cribado

Los scTCR de la presente invención se pueden emplear en métodos de cribado diseñados para identificar moduladores, incluidos los inhibidores, de la sinapsis inmunitaria celular mediada por el TCR.

Como saben los expertos existen varios formatos de ensayo que proporcionan una base adecuada para cribados de la interacción proteína-proteína de este tipo.

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

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

Otros ensayos ópticos de interfaz incluyen fluorescencia de reflexión interna total (TIRF), espejo resonante (RM) y un sensor óptico de acoplador de red de difracción (GCS) y se tratan más detalladamente en Woodbury y Venton (J. Chromatog. B. 725 113-137 (1999)). El ensayo de proximidad de centelleo (SPA) ha sido utilizado para cribar quimiotecas en busca de inhibidores de la interacción de baja afinidad entre CD28 y B7 ( $K_d$  probablemente en la región de 4  $\mu$ M (Van der Merwe et al J. Exp. Med. 185:393-403 (1997), Jenh *et al.*, Anal Biochem 165(2) 287-93 (1998)). SPA es un ensayo radiactivo que hace uso de la emisión de partículas beta de ciertos isótopos radiactivos que transfieren energía a una sustancia centelleante inmovilizada en la superficie del indicador. El corto alcance de las partículas beta en solución asegura que sólo se produce centelleo cuando las partículas beta se emiten muy próximas a la sustancia centelleante. Cuando se aplica para la detección de interacciones proteína-proteína, una de las partes de la interacción se marca con el radioisótopo, mientras que la otra se une a las perlas que contienen una sustancia centelleante o se aplica sobre una superficie junto con la sustancia centelleante. Si el ensayo se puede configurar óptimamente, el radioisótopo se llevará suficientemente cerca de la sustancia centelleante para que la emisión de fotones se active sólo cuando se produzca la unión entre las dos proteínas.

Otro aspecto de la invención es un método para identificar un inhibidor de la interacción entre un scTCR y un ligando del TCR elegido entre complejos péptido-MHC, complejos CD1-antígeno, superantígenos y complejos péptido-MHC/superantígeno que comprende poner en contacto el scTCR con el ligando del scTCR contraparte de la unión, en presencia y en ausencia de un compuesto de prueba, y determinar si la presencia del compuesto de prueba reduce la unión del scTCR con el ligando, considerándose dicha reducción como identificadora de un inhibidor.

Otro aspecto de la invención es un método para identificar un posible inhibidor de la interacción entre un scTCR y un ligando del TCR elegido entre complejos péptido-MHC, complejos CD1-antígeno, superantígenos y complejos péptido-MHC/superantígeno que comprende poner en contacto el scTCR con un ligando del scTCR contraparte de la unión con un compuesto de prueba, y determinar si el compuesto de prueba se une al scTCR y/o el ligando, considerándose dicha unión como identificadora de un posible inhibidor. Este aspecto de la invención puede encontrar utilidad particular en ensayos ópticos de interfaz como los llevados a cabo utilizando el sistema BIAcore™.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica un scTCR de la invención, así como un vector que contiene dicho ácido nucleico.

## Ejemplos

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

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

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

La figura 2a muestra la secuencia de aminoácidos extracelular de la cadena  $\alpha$  del TCR A6, que incluye la mutación T<sub>48</sub> → C (subrayada) utilizada para producir el nuevo enlace disulfuro intercatenario, y la figura 2b muestra la secuencia de aminoácidos extracelular de la cadena  $\beta$  del TCR A6, que incluye la mutación S<sub>57</sub> → C (subrayada) utilizada para producir el nuevo enlace disulfuro intercatenario;

La figura 3 muestra la secuencia de ADN y de aminoácidos del conector Gly/Ser (30 mer);

La figura 4 resume la estrategia de clonación utilizada para producir el scDiS del TCR A6;

La figura 5a muestra la secuencia de ADN del scDiS del TCR A6;

La figura 5b muestra la secuencia de aminoácidos del scDiS del TCR A6;

La figura 6 ilustra la elución de la proteína scDiS del TCR A6 desde una columna de intercambio iónico POROS 50HQ utilizando un gradiente de NaCl de 0-500 mM, como se indica por la línea recta;

La figura 7 muestra los resultados tanto de SDS-PAGE en condiciones reductoras de geles (coloreados con azul de Coomassie) como de SDS-PAGE en condiciones no reductoras de geles (coloreados con azul de Coomassie) de las fracciones A15, B10, B9 y B3 de la corrida de la columna ilustrada por la figura 6. Las fracciones B9 y B10 contienen claramente proteína correspondiente al tamaño esperado para el scDiS del TCR A6;

La figura 8 ilustra la elución del scDiS del TCR A6 desde una columna de filtración en gel Superdex 200 de las fracciones B10-B7 de la corrida de la columna de intercambio iónico que se muestra en la figura 6;

La figura 9 muestra los resultados tanto de SDS-PAGE en condiciones reductoras de geles (coloreados con azul de Coomassie) como de SDS-PAGE en condiciones no reductoras de geles (coloreados con azul de Coomassie) de las fracciones B8, B7, B3 y B2 de la corrida de la columna de filtración en gel ilustrada por la figura 8. La fracción B7 contiene claramente proteína correspondiente al tamaño esperado para el scDiS del TCR A6;

La figura 10 es una corrida de filtración en gel final en tampón BIAcore de las fracciones concentradas B9-B6 de la corrida de filtración en gel que se muestra en la figura 8. El scDiS del TCR A6 eluye como un único pico principal;

La figura 11 son los datos BIAcore para la unión del scDiS del TCR A6 a HLA-A2 TAX;

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

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

5'-C ACA GAC AAA tgT GTG CTA GAC AT  
5'-AT GTC TAG CAC Aca TTT GTC TGT G

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

5'-C AGT GGG GTC tGC ACA GAC CC  
5'-GG GTC TGT GCa GAC CCC ACT G

Mutagénesis por PCR:

Los plásmidos de expresión que contienen los genes para las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  de TCR A6 Tax se mutaron utilizando los cebadores de la cadena  $\alpha$  o los cebadores de la cadena  $\beta$ , respectivamente, de la manera siguiente. Se mezclaron 100 ng de plásmido con 5  $\mu$ l de dNTP 10 mM, 25  $\mu$ l de tampón 10 x Pfu (Stratagene), 10 unidades de polimerasa Pfu (Stratagene) y el volumen final se ajustó a 240  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O. Se complementaron 48  $\mu$ l de esta mezcla con cebadores diluidos para dar una concentración final de 0.2  $\mu$ M en 50  $\mu$ l de volumen de reacción final. Después de un paso de desnaturalización inicial de 30 segundos a 95 °C, la mezcla de reacción se sometió a 15 rondas de desnaturalización (95 °C, 30 s), apareamiento (55 °C, 60 s) y elongación (73 °C, 8 min.) en un equipo de PCR Hybaid PCR express. Después el producto se digirió durante 5 horas a 37 °C con 10 unidades de enzima de restricción DpnI (New England Biolabs). Se transformaron 10  $\mu$ l de la reacción digerida en bacterias XL1-Blue

competentes y se cultivaron durante 18 horas a 37 °C. Se picó una sola colonia y se cultivó durante la noche en 5 ml de TYP + ampicilina (16 g/l de Bacto-triptona, 16 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 2.5 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg/l de ampicilina). El ADN plasmídico se purificó en una columna mini-prep Qiagen según las instrucciones del fabricante y la secuencia se verificó mediante secuenciación automatizada en el centro de secuenciación del Departamento de Bioquímica, de la Universidad de Oxford. Se muestran las respectivas secuencias mutadas de ácido nucleico y aminoácidos en las figuras 1a y 2a para la cadena  $\alpha$ , y en las figuras 1b y 2b para la cadena  $\beta$ .

Ejemplo 2 - Diseño, expresión y análisis de un TCR A6 de una sola cadena que incorpora un nuevo enlace disulfuro intercatenario.

Se usaron vectores de expresión que contenían las secuencias de ADN de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR A6 mutado que incorporan los residuos de cisteína adicionales necesarios para la formación de un nuevo enlace disulfuro, preparadas en el ejemplo 1 y como se muestra en la figuras 1a y 1b, como base para la producción de un TCR A6 de una sola cadena, con la excepción de que el codón de parada (TAA) se eliminó del extremo de la secuencia de la cadena  $\alpha$ , de la manera siguiente:

El scDiS del TCR A6 contiene una secuencia conectora de 30 aminoácidos entre el extremo C-terminal de la cadena  $\alpha$  del TCR y el extremo N-terminal de la cadena  $\beta$ . La figura 3 muestra la secuencia de ADN y de aminoácidos de este conector. La estrategia de clonación empleada para producir el scDiS del TCR A6 se resume en la figura 4.

Brevemente, las cadenas alfa y beta del dsTCR A6 se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores que contenían sitios de restricción como se muestra en la figura 4, es decir:

```
Cebador alfa 5': ccaaggccatgcatgagaaggaagtggagcagaactct
Cebador alfa 3': ttggcccgccggatccgccccggggaactttctgggctgggg
Cebador beta 5': tccccggggcgatccggcggcccaacgctgggtcactcag
Cebador beta 3': gggaagcttagtctgctctacccaggcctcg
```

Los dos fragmentos generados de esta manera fueron unidos mediante PCR utilizando los cebadores 5' alfa y 3' beta para dar un TCR de una sola cadena con un conector corto que contiene los sitios XmaI-BamHI-ApaI. Este fragmento se clonó en pGMT7. El conector entero se insertó después en dos etapas, en primer lugar se insertó un fragmento de 42 bp utilizando los sitios XmaI y BamHI:

```
5' -CC GGG GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGT TCA GGC GGT GGC G -3'
3' - C CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCA AGT CCG CCA CCG CCT AG-5'
```

En segundo lugar, se insertó un fragmento de 48 bp utilizando los sitios BamHI y ApaI para crear un conector de 90 bp entre el extremo 3' de la cadena alfa y el extremo 5' de la cadena beta. Se preparó un fragmento de 48 bp mediante extensión por PCR de una mezcla de los oligos siguientes:

```
5' - GC GGA TCC GGC GGT GGC GGT TCG GGT GGC GGT GGC TC-3'
3' - CCA AGC CCA CCG CCA CCG AGT CCG CCA CCG CCC GGG TG -5'
```

El producto de esta extensión se digirió con BamHI y ApaI y se ligó en el plásmido digerido que contenía el fragmento de conector de 42 bp.

La secuencia completa del ADN y de aminoácidos del scDiS del TCR A6 se muestra en las figuras 5a y 5b, respectivamente.

Expresión y purificación del TCR A6 de una sola cadena unido por disulfuro:

El plásmido de expresión que contenía el TCR A6 de una sola cadena unido por disulfuro se transformó en la cepa BL21pLysS de E.coli, y se cultivaron colonias individuales resistentes a la ampicilina a 37 °C en medio TYP (ampicilina 100  $\mu$ g/ml) a una DO<sub>600</sub> de 0.4, antes de inducir la expresión de la proteína con IPTG 0.5 mM. Se cosecharon las células tres horas después de la inducción por centrifugación durante 30 minutos a 4000 rpm en un equipo Beckman J-6B. Los sedimentos celulares se volvieron a suspender en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, sacarosa al 25% (p/v), NaEDTA 1 mM, NaAzida al 0.1% (p/v), DTT 10 mM, pH 8.0. Después de un paso de congelación-descongelación de toda la noche, las células resuspendidas se sometieron a ráfagas de ultrasonido de 1 minuto por un total de alrededor de 10 minutos en un equipo de ultrasonido Milsonix XL2020 usando una sonda estándar de 12 mm de diámetro. Se recuperaron sedimentos de cuerpos de inclusión por centrifugación durante 30 minutos a 13000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Luego se llevaron a cabo tres lavados con detergente para eliminar los desechos celulares y los componentes de membrana. Cada vez se homogeneizó el sedimento de cuerpos de inclusión en tampón Triton (Tris-HCl 50 mM, Triton-X100 al 0.5%, NaCl 200 mM, NaEDTA 10 mM, NaAzida al 0.1% (p/v), DTT 2 mM, pH 8.0) antes de ser sedimentado por centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm en una centrífuga Beckman J2-21. Después se eliminaron el detergente y la sal mediante un lavado similar en el

tampón siguiente: Tris-HCl 50 mM, NaEDTA 1 mM, NaAzida al 0.1% (p/v), DTT 2 mM, pH 8.0. Finalmente, los cuerpos de inclusión se dividieron en alícuotas de 30 mg y se congelaron a -70 °C. Se cuantificó la proteína de los cuerpos de inclusión solubilizando con guanidina-HCl 6 M y midiendo con un ensayo de unión a tinción Bradford (PerBio).

Aproximadamente 15 mg de cada cadena de cuerpos de inclusión solubilizada se descongelaron de la reserva congelada. Los cuerpos de inclusión se diluyeron hasta una concentración final de 5 mg/ml en solución de guanidina 6 M y se les agregó DTT (madre 2 M) hasta una concentración final de 10 mM. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se preparó 1 litro de tampón de replegamiento siguiente: Tris 100 mM pH 8.5, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0.5 mM, urea 5 M, PMSF 0.2 mM y se agitó vigorosamente a 5 °C ± 3 °C. La cupla redox (2-mercaptoetilamina y cistamina (hasta concentraciones finales de 6.6 mM y 3.7 mM, respectivamente) se agregó aproximadamente 5 minutos antes de la adición de las cadenas de TCR desnaturalizadas. Después se permitió que la proteína se volviera a plegar en el transcurso de aproximadamente 5 horas ± 15 minutos con agitación a 5 °C ± 3 °C. La proteína replegada se dializó después dos veces, en primer lugar contra 10 litros de urea 100 mM, en segundo lugar contra 10 litros de urea 100 mM, Tris 10 mM pH 8.0. Ambos pasos de replegamiento y diálisis se llevaron a cabo a una temperatura entre 6 y 8 °C.

Se separó el scTCR de los productos de degradación y las impurezas cargando la proteína replegada dializada en una columna de intercambio aniónico POROS 50HQ y eluyendo la proteína unida con un gradiente de NaCl de 0-500 mM en 50 volúmenes de columna utilizando un purificador Akta (Pharmacia) como en la figura 6. Las fracciones correspondientes a los picos se almacenaron a 4 °C y se analizaron por SDS-PAGE con coloración con azul de Coomassie (Figura 7) antes de juntarlas y concentrarlas. Después el scTCR se purificó y caracterizó utilizando una columna de filtración en gel Superdex 200HR (Figura 8) preequilibrada en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3.5 mM, nonidet p40 al 0.05%). Las fracciones correspondientes a los picos se almacenaron a 4 °C y se analizaron por DS-PAGE con coloración con azul de Coomassie (Figura 9) antes de juntarlas y concentrarlas. Finalmente, se corrieron las fracciones B9-B6 concentradas en otro paso de filtración en gel para producir proteína purificada en tampón BIAcore, (Figura 10). Se juntó el pico que eluye a un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa. Éste se concentró antes de la caracterización por análisis de resonancia de plasmones superficiales BIAcore.

Ejemplo 3 - Caracterización por resonancia de plasmón superficial BIAcore de scTCR uniéndose a HLA-A2 Tax

Se usó un biosensor de resonancia de plasmón superficial (BIAcore 3000™) para analizar la unión del scTCR A6 a su ligando péptido-MHC (HLA-A2 Tax). Esto fue facilitado mediante la producción de complejos pMHC individuales (descritos a continuación) que se inmovilizaron en una superficie de unión recubierta con estreptavidina de manera semiorientada, permitiendo el análisis eficaz y simultáneo de la unión de un receptor de linfocitos T soluble con hasta cuatro pMHC diferentes (inmovilizados en celdas de flujo diferentes). La inyección manual del complejo HLA permite manipular fácilmente el nivel exacto de moléculas clase I inmovilizadas.

Dichos complejos inmovilizados son capaces de unirse tanto a los receptores de los linfocitos T como al correceptor CD8αα, y ambos pueden ser inyectados en la fase soluble.

Los complejos HLA-A2-Tax biotinilados clase I se volvieron a plegar in vitro a partir de cuerpos de inclusión expresados en bacterias que contenían proteínas y péptidos sintéticos constituyentes de la subunidad, seguido de purificación y biotinilación enzimática in vitro (O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). La cadena pesada HLA se expresó con un marcador de biotinilación C-terminal que reemplaza los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína en un constructo apropiado. La cadena ligera HLA o β2-microglobulina también se expresó como cuerpos de inclusión en E. coli a partir de un constructo apropiado, a un nivel de ~500 mg/litro de cultivo bacteriano.

Se lisaron células de E. coli y se purificaron los cuerpos de inclusión hasta aproximadamente 80% de pureza. Se desnaturalizó la proteína de los cuerpos de inclusión en guanidina-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8.1, NaCl 100 mM, DTT 10 mM, EDTA 10 mM y se volvió a plegar a una concentración de 30 mg/litro de cadena pesada, 30 mg/litro de β2m en L-Arginina-HCl 0.4 M, Tris 100 mM, pH 8.1, cistamina 3.7 mM, cisteamina mM, 4 mg/ml de péptido (por ejemplo tax 11-19), mediante adición de un solo pulso de proteína desnaturalizada en tampón de replegamiento a <5 °C. Se permitió que el replegamiento se completara a 4 °C durante al menos 1 hora.

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

Se cambió el tampón de los complejos HLA marcados con biotilación por Tris 10 mM, pH 8.1, NaCl 5 mM utilizando una columna de desalinización rápida Pharmacia equilibrada en el mismo tampón. Inmediatamente después de la elución, las fracciones que contenían proteína se enfriaron en hielo y se les agregó cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem). Luego se añadieron los reactivos de biotilación: biotina 1 mM, ATP 5 mM (tamponado a pH 8), MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM y 5 µg/ml de enzima BirA (purificada según O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266: 9-15). Después la mezcla se dejó en incubación a temperatura ambiente durante la noche.

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

Las interacciones entre el scTCR A6 Tax que contiene un nuevo enlace intercatenario y su ligando/complejo MHC o una combinación de HLA-péptido no pertinente, cuya producción se describe antes, se analizaron en un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIAcore 3000™. La RPS mide los cambios en el índice de refracción expresados en unidades de respuesta (RU) en la proximidad de la superficie de un sensor dentro de una celda de flujo pequeña, un principio que se puede utilizar para detectar interacciones receptor-ligando y para analizar su afinidad y parámetros cinéticos. Se prepararon celdas de flujo de la sonda por inmovilización de los complejos HLA-péptido individuales en celdas de flujo diferentes mediante la unión entre la biotina reticulada en β2m y la estreptavidina que había sido químicamente reticulada a la superficie activada de las celdas de flujo. Después este ensayo se realizó pasando scTCR sobre las superficies de las diferentes celdas de flujo a una velocidad de flujo constante, midiendo la respuesta de SPR al hacerlo. Se utilizaron inyecciones de sTCR soluble a una velocidad de flujo constante y concentraciones diferentes sobre el complejo HLA-péptido para definir la resonancia de fondo. Los valores de estas medidas de control se sustrajeron de los valores obtenidos con el complejo HLA-péptido específico y se usaron para calcular las afinidades de unión expresadas como la constante de disociación, K<sub>d</sub> (Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2ª Edición) 1979, Clarendon Press, Oxford).

El análisis BIAcore del scDiS del TCR A6 demostró que esta molécula se unió específicamente su ligando cognado (HLA-A2 TAX) con una k<sub>d</sub> de 12.4 ± 1.62 µM.

## REIVINDICACIONES

1. Un receptor de linfocitos T de una sola cadena (scTCR) que contiene un segmento  $\alpha$  constituido por una secuencia de la región variable de la cadena  $\alpha$  del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia extracelular de la región constante de la cadena  $\alpha$  del TCR, un segmento  $\beta$  constituido por una región variable de la cadena  $\beta$  del TCR fusionada al extremo N terminal de una secuencia extracelular de la región constante de la cadena  $\beta$  del TCR, y una secuencia conectora que une el extremo C terminal del segmento  $\alpha$  con el extremo N terminal del segmento  $\beta$ , o vice versa, donde las secuencias extracelulares de las regiones constantes de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  están unidas por un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína sustituidos en  
5 Thr 48 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 57 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o  
10 Thr 45 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 77 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o  
Tyr 10 del exón 1 de TRAC\*01 y Ser 17 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o  
Thr 45 del exón 1 de TRAC\*01 y Asp 59 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01; o  
15 Ser 15 del exón 1 de TRAC\*01 y Glu 15 del exón 1 de TRBC1\*01 o TRBC2\*01;  
siendo la longitud de la secuencia conectora y la posición del enlace disulfuro tales que las secuencias de las regiones variables de los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  están mutuamente orientadas esencialmente como en los receptores de linfocitos T  $\alpha\beta$  nativos.
2. Un scTCR como el que se reivindica en la reivindicación 1, en el que las secuencias extracelulares de las regiones constantes presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden a las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un TCR nativo truncadas en sus extremos C terminales de modo que los residuos de cisteína que forman el enlace disulfuro intercatenario nativo del TCR son excluidos.
- 20 3. Un scTCR como el que se reivindica en la reivindicación 1, en el que las secuencias extracelulares de las regiones constantes presentes en los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden a las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de un TCR nativo en el cual los residuos de cisteína que forman el enlace disulfuro intercatenario nativo están sustituidos por otro residuo de aminoácido.
- 25 4. Un scTCR como el que se reivindica en la reivindicación 3, en el que dichos residuos de cisteína están sustituidos por serina o alanina.
- 30 5. Un scTCR como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la secuencia conectora tiene la fórmula -P-AA-P- en la que P es prolina y AA representa una secuencia de aminoácidos en la que los aminoácidos son glicina y serina.
- 35 6. Un scTCR, como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que un residuo de cisteína no apareado presente en la cadena  $\beta$  del TCR nativo no está presente.
- 40 7. Un complejo multivalente de receptores de linfocitos T (TCR) que contiene varios scTCR como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. Un scTCR como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un complejo como el reivindicado en la reivindicación 7 que está unido covalentemente a un agente terapéutico.
- 45 9. Una composición que contiene un scTCR o un complejo multivalente de scTCR como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica un scTCR como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 50 11. Un vector que contiene una molécula de ácido nucleico como la reivindicada en la reivindicación 10.

Figura 1a

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagagggagccatt  
gcctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttcccagtccttcttctggtacaga  
caatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggtgacaaa  
gaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtatgtttctctgctc  
atcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgccgttacaactgac  
agctgggggaaattgcagtttgagcagggaccaggttggtggtcaccagatc  
cagaacctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtct  
gtctgcctattcaccgattttgattctcaaaacaatgtgtcacaagtaaggattct  
gatgtgtatatcacagacaaatgtgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagc  
aacagtgtgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaagccttcaac  
aacagcattattccagaagacacctcttccccagcccagaaagttcctaa

Figura 1b

atgaacgctggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc  
atgacactgcagtggtgccaggatgaacctgaatacatgtcctggtatcgacaa  
gaccagcatggggctgaggtgattcattactcagttggtgctggtatcactgac  
caaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccg  
ctcaggtgctgtcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg  
ccgggactagcgggagggcgaccagagcagtacttcgggccgggcaccaggtcacg  
gtcacagaggacctgaaaaacgtggttcccacccgaggtcgctgtggttgagccatca  
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggcttc  
taccgccaccagtgagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg  
gtctgcacagacccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatac  
gctctgagcagccgctgaggtctcggccaccttctggcaggacccccgcaaccac  
ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcgggagaatgacgagtggaaccaggat  
agggccaaacccgtcaccagatcgtcagcggcaggcctggggtagagcagactaa



Figura 2a

MQ  
 K<sub>1</sub>EVEQNSGPL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY  
 SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VSLLRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLFQ  
 GAGTQVVVTP DIQNPDPVAV QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSQSKDS  
 DVYITDKC<sub>V</sub>L DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS  
 PESS\*

Figura 2b

M  
 N<sub>1</sub>AGVTQTPKF QVLKTGQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV  
 GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLS AAPSQTSVYF CASRPGLAGG  
 RPEQYFGPGT RLTVTEDLKN VFPPEVAVFE PSEAEISHTQ KATLVCLATG  
 FYPDHVELSW WVNGKEVHSG VCTDPQPLKE QPALNDSRYA LS.SRLRVSAT  
 FWQDPRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRAD\*

P G G G S G G G G S G G G G  
 CCC GGG GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGT TCA GGC GGT GGC GGA  
 GGG CCC CCA CCG AGA CCG CCA CCG CCA AGT CCG CCA CCG CCT

S G G G G S G G G S G G G  
 TCC GGC GGT GGC GGT TCG GGT GGC GGT GGC TCA GGC GGT GGC  
AGG CCG CCA CCG CCA AGC CCA CCG CCA CCG AGT CCG CCA CCG

G P  
 GGG CCC  
 CCC GGG

Figura 3

Figura 4

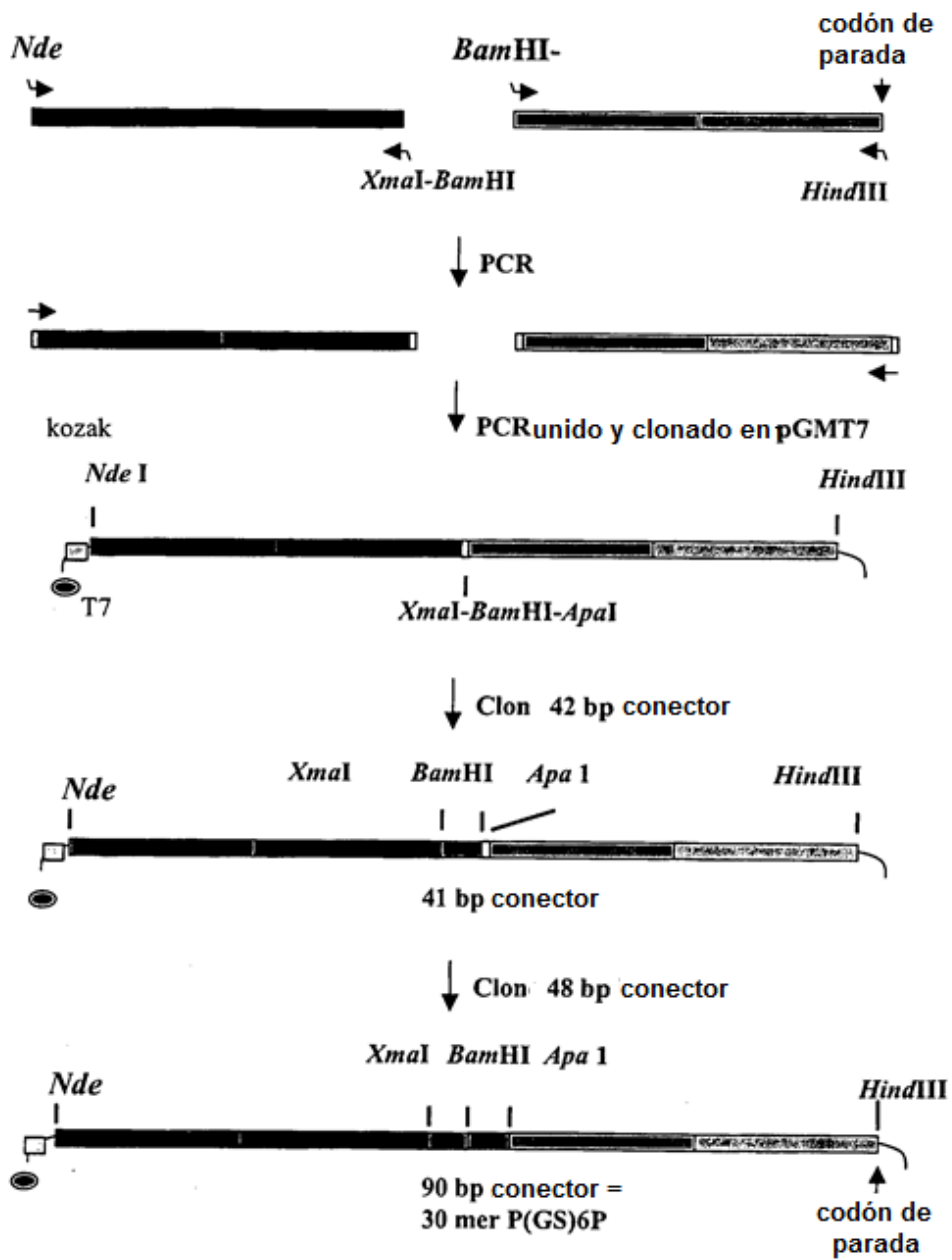


Figura 5a

atgcagaaggaagtgcaggaactctggacccctcagtgctccagagggagcaccatgcctctctcaactgcaactacagtgaccgggtcccacagtcctctttcttgggt  
acagacaatactctggaaaagcctcagttgataatgtccatactcctcaatctccatcccaatggtgacaaagaagatgaagggttacagcacagctcaataaagccagccagcagtagt  
tctctctcatccaggaactcccagccagtgattccagccacctaccctctgtccgttcaacctgacagctgggggaaattgcaagtttgagcagggaccaggtgtg  
gtcaccacagatatacagaacctgaacctgccgtgacagctgagagactcaaatccagtgacaagtctgtcctgccattaccgattttgattctcaaacaaatg  
tgcacaaaagtaaggattctgatgtatatacacagacaaaatgtgtgtacatgaggtctatgactcaagagcaaacagtctgtggcctggagcaaacaaaatctga  
ctttgcatgtgcaaacccctcaaacagcaatattcacaagacaccttctcccagccccaaaagttcccggggggtgactcggcctggcgggtccagggcgtg  
ggcggatcccggcgggtggcggttcgggtggcggtggctcagggcggggcccaacctgggtcactcagaccccacaataatcccagctctgaagacaggaagacagca  
tgacctgcagtggtccccaggatgaacctgaatcctggtatcgcaagaccagggcctggggtgaggtgacttactccagtttggtggtatcac  
tgaccaaaggaagtcccccaatggtacaatgtctccagatcaaacacagaggaattccccgtcaggtctgtcaggtctccctcccagacatctgtacttctgt  
gccagcggggcgggactagcgggaggcgaccagagcagtactcggggcccggccagggctccaggtccacagagacctgaaaaaagctgtcccacccagggtcgctg  
tgtttgagccatcagaagcagagatctcccacccccaaaagcaccactggtgtgacctggccacaggtcttacccccagaccagtgagctgggtggatggaatgg  
gaaggaggtagcagtaggggtctgacacagaccggccctcaaggagcagccccctcaatgaactccagatagcctgtagcagccgctgagggtctcgcccacc  
tctcggcaggacccccccaacctctccgtctgaagctctcagggtctcgggagatgacgagtgagggcccaaacccgtcaccaccagatcgta  
gcgccgggacctgggtagagcaactaa

Figura 5b

MQKEVQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSISYNSGDKEDGR  
FTAQLNKASQYVSLLRDSQPDSATYLCAVTTDSWGLKQFGAGTQVVVTPDIQNPDPAV  
YQLRDSKSSDKSVCFLTDFDSQTNVSQKSDSDYITDKCVLDMRSMDFKSNVA WSNKS  
DFACANAFNNSIIPEDTFPSPESPSSPGGGGGGGSGGGGGGGGGGGGGGNAGVT  
QTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPPNG  
YNVSRSTTEDFPLRLLSAPSQTSVYFCASRPLAGGRPEQYFGPGLTLVTEDEDLKSNVFPF  
EVA VFEPEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL  
NDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVI VSAEA WGR  
AD Parada

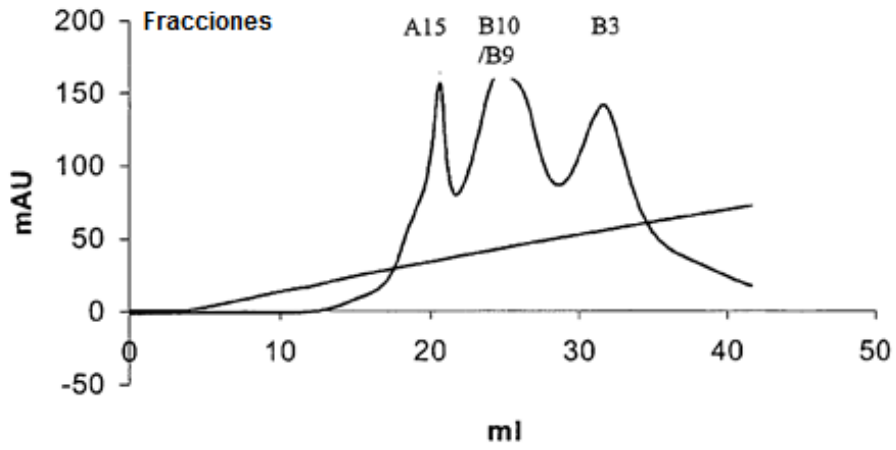


Figura 6

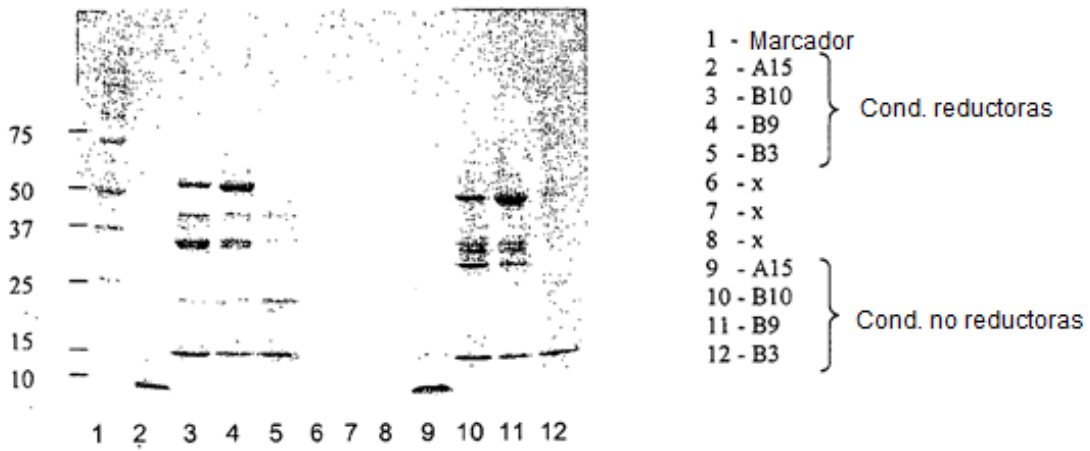


Figura 7

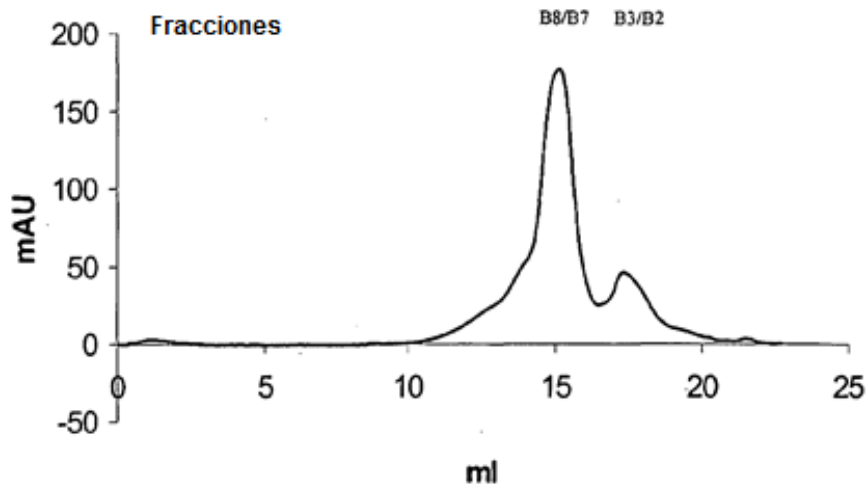


Figura 8

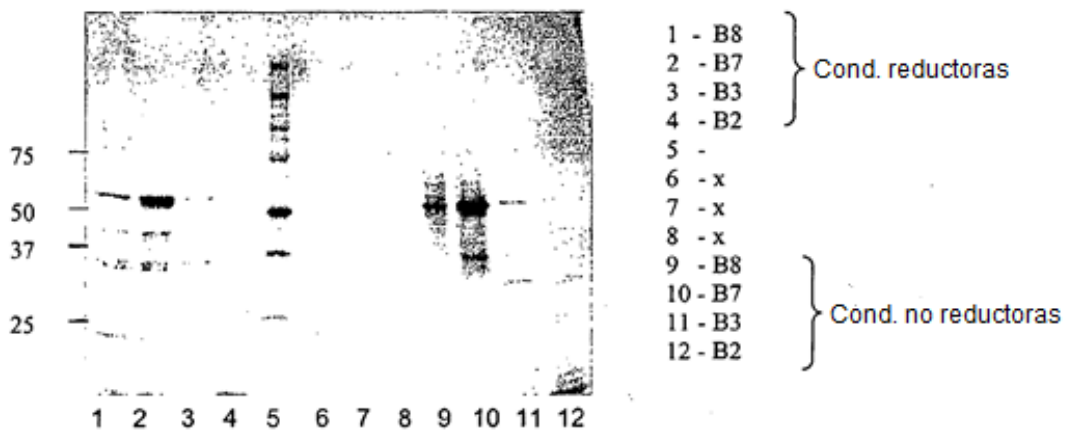


Figura 9

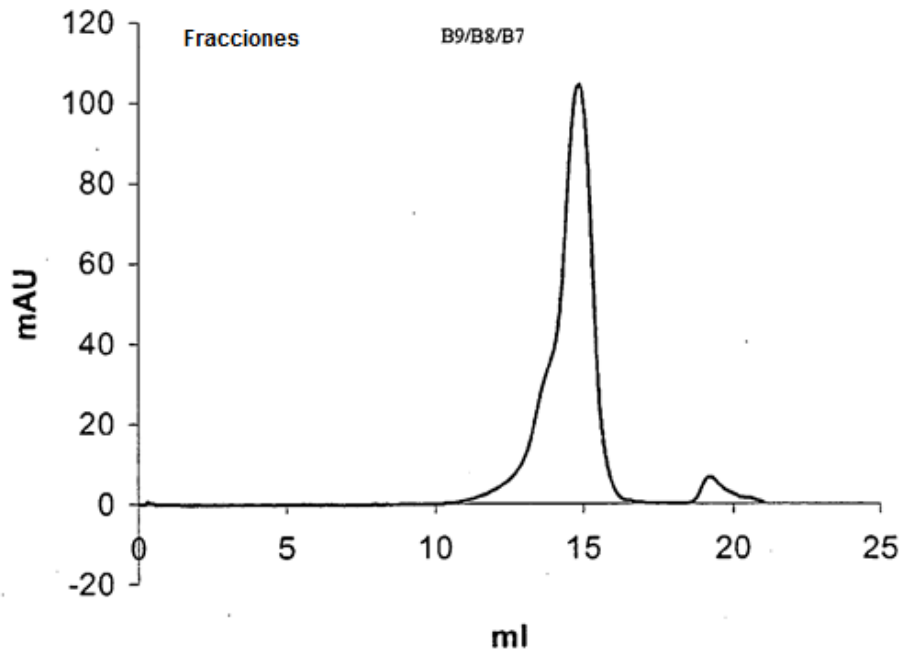


Figura 10

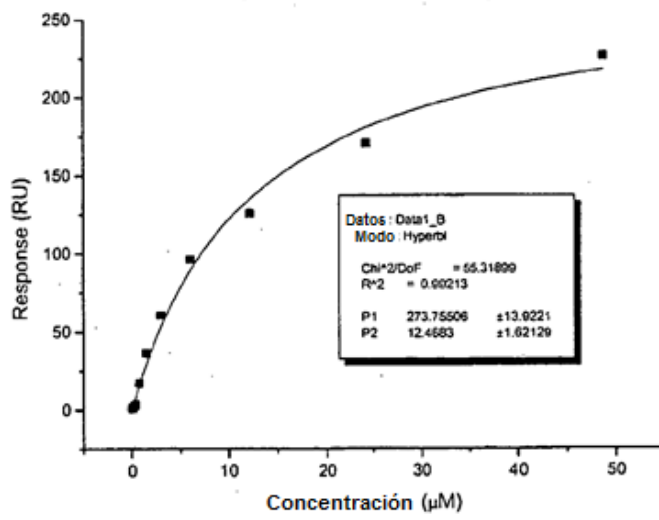


Figura 11